

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Nikolina Piteša

**INTERAKCIJA SIGNALNIH PUTEVA RAS/RAF/MAPK I HEDGEHOG-  
GLI U REZISTENCIJI NA LIJEKOVE U STANIČNIM LINIJAMA  
MELANOMA ČOVJEKA**

Doktorski rad

Osijek, 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni  
studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti  
**Znanstvena polja:** Biologija i temeljne medicinske znanosti

### INTERAKCIJA SIGNALNIH PUTEVA RAS/RAF/MAPK I HEDGEHOG-GLI U REZISTENCIJI NA LIJEKOVE U STANIČNIM LINIJAMA MELANOMA ČOVJEKA

Nikolina Piteša

**Disertacija je izrađena u:** Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu  
Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

**Mentor:** doc.dr.sc. Maja Sabol, viša znanstvena suradnica

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

Melanom predstavlja najagresivniji oblik tumora kože zbog visokog metastatskog potencijala i razvoja otpornosti na terapiju u primjeni. Signalni put RAS/RAF/MAPK je najčešće promijenjen u melanomu te je poznato da nekanonski aktivira signalni put Hedgehog-GLI koji također regulira brojne aspekte karcinogeneze u melanomu. Točni mehanizmi interakcije ova dva signalna puta i dalje nisu dovoljno istraženi te predstavljaju veliki potencijal za razvoj kombinirane terapije, jedne od strategija za nadilaženje mehanizama otpornosti na terapiju. Iz tog razloga, u ovoj doktorskoj disertaciji je istražena međusobna interakcija RAS/RAF/MAPK i Hedgehog-GLI u rezistenciji na lijekove koristeći dva istraživačka pravca. Prvi istraživački smjer se temelji na identifikaciji transkripcijskih meta proteina GLI koje su potencijalno vezane za signalni put RAS/RAF/MAPK, a drugi na razvoju staničnih linija melanoma rezistentnih na GANT61, specifični inhibitor proteina GLI. Rezultati pokazuju da ovisno o mutacijskom statusu gena *NRAS*, rezistentne stanične linije imaju različitu aktivnost signalnih puteva te regulaciju staničnih procesa poput autofagije te staničnog ciklusa. U rezistentnoj staničnoj liniji s mutacijom u genu *NRAS* detektirana je smanjena ekspresija proteina RAB34, novoidentificirana transkripcijska meta proteina GLI. RAB34 kao jedan od važnih regulatora primarne cilije predstavlja potencijalnu vezu između RAS/RAF/MAPK i Hedgehog-GLI u rezistenciji na GANT61. Daljnjim istraživanjem se uvelike može doprinijeti temeljnim znanjima o interakciji između ova dva signalna puta.

**Broj stranica:** 156

**Broj slika:** 70

**Broj tablica:** 17

**Broj literaturnih navoda:** 314

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** RAS/RAF/MAPK, HH-GLI, melanom, rezistencija na lijekove

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. doc.dr.sc. Maja Herak Bosnar, znanstvena savjetnica
2. prof.dr.sc. Ljiljana Šerman, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju
3. prof.dr.sc. Đurđica Ugarković, znanstvena savjetnica
4. doc.dr.sc. Ana Čipak Gašparović, viša znanstvena suradnica

**Rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Interdisciplinary area of science

**Scientific Fields:** Biology and basic medical sciences

### **INTERACTION OF RAS/RAF/MAPK AND HEDGEHOG-GLI SIGNALING PATHWAYS IN THERAPY RESISTANCE IN HUMAN MELANOMA CELL LINES**

Nikolina Piteša

**Thesis performed at:** Laboratory for Hereditary Cancer, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

**Supervisor:** Assist. Prof. Maja Sabol, PhD

#### **Short abstract:**

Melanoma is the most aggressive skin cancer due to its high metastatic potential and therapy resistance occurrence. RAS/RAF/MAPK pathway is most frequently deregulated in melanoma and it is known for noncanonically activating Hedgehog-GLI pathway, which is also a strong regulator of many aspects of carcinogenesis in melanoma. The exact mechanisms of these interactions are still not fully understood, and they represent a huge potential for combined therapy development, one of the strategies for overcoming therapy resistance. For that purpose, two experimental directions were used within this doctoral thesis. The first experimental direction was focused on the identification of GLI transcription targets which may be connected to RAS/RAF/MAPK pathway, and the second on the establishment of cell lines resistant to GANT61 (a specific GLI protein inhibitor). Our results suggest that resistant cell lines according to their *NRAS* mutational status, show different signaling pathway activity and regulation of autophagy function and cell cycle. Downregulation of RAB34 a novel GLI transcription target, was detected in the *NRAS* mutated resistant cell line. RAB34 as an essential ciliogenesis regulator represents a potential mediator between RAS/RAF/MAPK and Hedgehog-GLI in GANT61 resistance. Future studies can bring new insights into RAS/RAF/MAPK and Hedgehog-GLI interplay and further upgrade our basic knowledge about these interactions.

**Number of pages:** 156

**Number of figures:** 70

**Number of tables:** 17

**Number of references:** 314

**Original in:** croatian

**Key words:** RAS/RAF/MAPK, Hedgehog-GLI, melanoma, therapy resistance

**Date of the thesis defense:**

#### **Reviewers:**

1. Assist. Prof. Maja Herak Bosnar, PhD, Senior Scientist
2. Prof. Ljiljana Šerman, PhD
3. Prof. Đurđica Ugarković, PhD, Senior Scientist
4. Prof. Ana Čipak Ugarković, PhD

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, UI. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za nasljedni rak Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Maje Sabol u sklopu projekta „Regulacija G1I koda u tumorima ovisnim o BRAF/NRAS mutacijama“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ IP-01-2018-4889).

## Zahvale

- *Hvala mojoj mentorici dr.sc. Maji Sabol za silno strpljenje, podizanje motivacije u trenucima kada je bilo teško te nesebično djeljenje znanja. Bolju mentoricu si nisam mogla poželjeti!*
- *Hvala ostalim sadašnjim i bivšim članovima LNR-a, Diani, Vesni, Petru, te posebno mojim curama Matei, Josipi i Tini bez čijih savjeta, svakodnevnog smijeha i stalne podrške ovo ne bi bilo jednako putovanje.*
- *Hvala svim ostalim kolegama sa Zavoda za molekularnu medicinu i Zavoda za molekularnu biologiju koji su uvijek uskakali u pomoć kada je to bilo potrebno, bilo vrijednim savjetom ili posudbom kemikalija.*
- *Hvala prof. Natalii Riobo del Galdo i njenoj prekrasnoj grupi koja me velikodušno ugodila, mnogo toga naučila te obogatila ovo iskustvo!*
- *Hvala mojoj obitelji i prijateljima što su uvijek vjerovali u mene i davali mi motiv za nastavak u trenucima kada je bilo najlakše odustati.*
- *Najveće hvala mom dragom suprugu Damiru, ti si moj najveći oslonac, volim te!*

## Popis kratica

ABC transporteri	transporteri s domenom koja vezuje ATP (eng. <i>ATP-binding-cassette</i> )
ANG 1 / 2	angiopoetin 1 / 2 (eng. <i>Angiopoietin 1 / 2</i> )
AMPK	protein kinaze aktivirane AMP-om (eng. <i>AMP-activated protein kinase</i> )
APS	amonijev persulfat (eng. <i>Ammonium persulfate</i> )
ATO	arsenov trioksid; nespecifični inhibitor proteina GLI
BAP1	protein povezan s BRCA1 (eng. <i>BRCA1 associated protein-1</i> )
BCA	bicinkonična kiselina (eng. <i>Bicinchoninic acid</i> )
BCL-2	protein B-stanica/limfom 2 (eng. <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i> )
BRAF	protoonkogen BRAF (eng. <i>B-Raf Proto-Oncogene</i> )
BSA	albumin iz goveđeg seruma (eng. <i>Bovine serum albumine</i> )
CDH1	E-kadherin
CDK	kinaza ovisna o ciklinima (eng. <i>Cyclin-dependent kinase</i> )
cDNA	komplementarna DNA (eng. <i>Complementary DNA</i> )
CDKN2A	inhibitor kinaza ovisnih o ciklinima 2A (eng. <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> )
ChIP-seq	nativna imunoprecipitacija kromatina uz sekvenciranje (eng. <i>Chromatin immunoprecipitation sequencing</i> )
CK1	kazeinska kinaza (eng. <i>Casein Kinase 1</i> )
CT	ciklus u kojem je pređen prag detekcije (eng. <i>Cycle of threshold</i> )
CTLA-4	protein povezan s citotoksičnim T limfocitima 4 (eng. <i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i> )
CYC	ciklopamin (eng. <i>Cyclopamine</i> ); specifični inhibitor SMO
DHH	eng. <i>Desert Hedgehog</i>
DMEM	eng. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfoksid (eng. <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
DSG	disucinimidil glutarat (eng. <i>Disuccinimidyl glutarate</i> )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (eng. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGF	epidermalni faktor rasta (eng. <i>Epidermal growth factor</i> )
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta (eng. <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
EMT	epitelno-mezenhimalna tranzicija (eng. <i>Epithelial mesenchymal transition</i> )
ERK	kinaze regulirane ekstracelularnim signalima (eng. <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> )
FBS	fetalni goveđi serum (eng. <i>Fetal bovine serume</i> )
GANT61	GLI antagonist 61; specifični inhibitor proteina GLI
GlaB	glabrescione B; specifični inhibitor proteina GLI1

GLI1	homolog onkogeno povezanog s gliomom 1 (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog 1</i> )
GLI2	homolog onkogeno povezanog s gliomom 2 (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog 2</i> )
GLI3	homolog onkogeno povezanog s gliomom 3 (eng. <i>Glioma-Associated Oncogene Homolog 3</i> )
GLI3FL	forma pune duljine proteina GLI3
GLIR	represorski oblik proteina GLI
GSK3 $\beta$	kinaza glikogen sintaze 3 $\beta$ (eng. <i>Glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i> )
HDAC6	histonska deacetilaza 6 (eng. <i>Histone deacetylase 6</i> )
HH	eng. <i>Hedgehog</i>
HH-GLI	Hedgehog-GLI
HHIP1	protein koji stupa u interakciju s Hedgehog 1 (eng. <i>Hedgehog interacting protein 1</i> )
HIF-1	faktor induciran hipoksijom 1 (eng. <i>Hypoxia inducible factor 1</i> )
HPI	inhibitori signalnog puta HH-GLI (eng. <i>Hedgehog pathway inhibitors</i> )
IFT	intraflagelarni transport (eng. <i>Intraflagellar transport</i> )
IHH	eng. <i>Indian Hedgehog</i>
IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10
JNK	c-JUN N-terminalne kinaze (eng. <i>c-Jun N-terminal kinases</i> )
KRAS	protoonkogen KRAS (eng. <i>KRAS Proto-Oncogene</i> )
LiCl	litijev klorid; specifični inhibitor GSK3 $\beta$
LncRNA	duge nekodirajuće RNA (eng. <i>Long noncoding RNAs</i> )
MALAT1	transkript adenokarcinoma pluća povezan s metastaziranjem 1 (eng. <i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i> )
MAPK	kinaza aktivirana mitogenom (eng. <i>Mitogen activated protein kinase</i> )
MGMT	O-6-metilguanin DNA metiltransferaza (eng. <i>O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i> )
MEK	MAP kinaza kinaza (eng. <i>MAP kinase kinase</i> )
MET	receptor za hepatocitni faktor rasta (eng. <i>Hepatocyte growth factor receptor</i> )
MIM	eng. <i>Missing in metastasis</i>
MITF	transkripcijski faktor koji inducira melanocyte (eng. <i>Melanocyte inducing transcription factor</i> )
MMP	metaloproteinaze matriksa (eng. <i>matrixmetalloproteinases</i> )
MRTF	transkripcijski faktor povezan s miokardinom (eng. <i>Myocardin related transcription factor</i> )

mTOR	meta rapamicin kinaze kod sisavaca (eng. <i>Mammalian Target of Rapamycin Kinase</i> )
MTT	eng. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2</i> )
NRAS	protoonkogen NRAS (eng. <i>NRAS Proto-Oncogene</i> )
NF-KB	nuklearni faktor kappa B (eng. <i>Nuclear Factor Kappa B</i> )
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatima (eng. <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PD1	protein programirane stanične smrti 1 (eng. <i>Programmed Cell Death 1</i> )
PDD	domena koja determinira procesiranje proteina (eng. <i>Processing determinant domain</i> )
PDGF	trombocitni faktor rasta (eng. <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )
PI3K	eng. <i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase</i>
PKA	protein kinaza 1 (eng. <i>Protein kinase A</i> )
PTCH1	eng. <i>Patched 1</i>
RNA	ribonukleinska kiselina (eng. <i>ribonucleic acid</i> )
RPMI	eng. <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RSK	ribosomalna kinaza S6 (eng. <i>Ribosomal S6 kinase</i> )
RTK	receptorska tirozin kinaza (eng. <i>Receptor tyrosine kinase</i> )
SDS	natrijev dodecil sulfat (eng. <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SHH	eng. <i>Sonic Hedgehog</i>
SNAI1	transkripcijski represor obitelji proteina Snail 1 (eng. <i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i> )
SMO	eng. <i>Smoothened</i>
SPP1	Osteopontin
SUFU	eng. <i>Supressor of Fused</i>
TCGA	eng. <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEMED	Tetrametiletilendiamin (eng. <i>Tetramethylethylenediamine</i> )
TGF-β	transformirajući faktor rasta β (eng. <i>Transforming growth factor β</i> )
TNM stupnjevanje	tumor-lifmni čvor-metastaza stupnjevanje (eng. <i>Tumor Node Metastasis</i> )
UV	ultraljubičasto zračenje (eng. <i>Ultraviolet light</i> )
VEGF	vaskularni epitelni faktor rasta (eng. <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
VIM	vimentin

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Melanom kože .....	2



1.2	Signalni put RAS/RAF/MAPK.....	4
1.3	Signalni put Hedgehog-GLI .....	7
1.3.1	Kanonski prijenos signala.....	7
1.3.2	Transkripcijski faktori GLI.....	9
1.3.3	Primarna cilija .....	12
1.3.4	Uloga signalnog puta Hedgehog-GLI u embrionalnom razvoju i odraslom organizmu.....	15
1.3.5	Uloga signalnog puta Hedgehog-GLI u karcinogenezi.....	16
1.4	Nekanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog-GLI.....	20
1.4.1	Interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI.....	21
1.5	Signalni put Hedgehog-GLI kao terapijska meta.....	23
1.6	Otpornost tumorskih stanica na kemijske spojeve .....	29
1.6.1	Signalni put Hedgehog-GLI u otpornosti stanica na kemijske spojeve.....	29
1.6.2	Signalni put RAS/RAF/MAPK u otpornosti stanica na kemijske spojeve.....	32
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA .....	34
3.	MATERIJALI I METODE .....	35
3.1	Materijali .....	36
3.2	Rad sa staničnim kulturama .....	36
3.2.1.	Odmrzavanje stanica .....	36
3.2.2	Presadivanje i održavanje stanica u kulturi.....	36
3.2.3	Zamrzavanje stanica .....	37
3.2.4	Uspostava rezistentnih staničnih linija .....	37
3.2.5	Transfekcija stanica .....	38
3.2.6	Test MTT .....	39
3.2.7	Analiza sposobnosti formiranja kolonija stanica.....	40
3.2.8	Analiza migracijske sposobnosti stanica .....	41
3.3	Analiza ekspresije gena, lncRNA i miRNA.....	42
3.3.1	Izdvajanje RNA iz stanica.....	42
3.3.2	Mjerenje koncentracije RNA.....	42

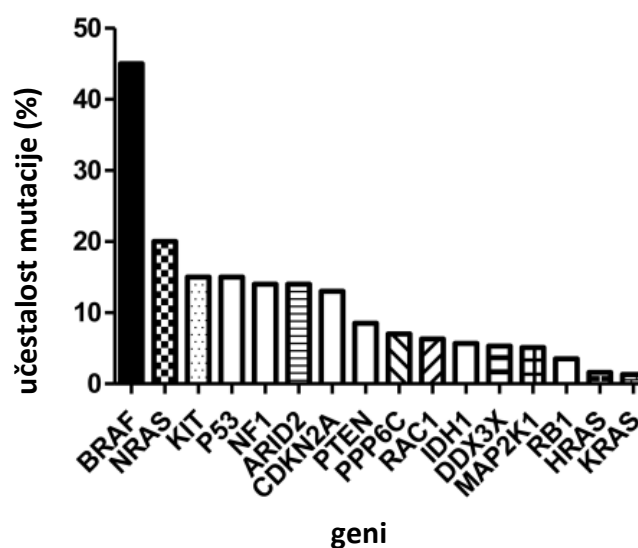
3.3.3	Reverzna transkripcija.....	42
3.3.4	Kvantitativna lančana reakcija polimerazom.....	44
3.3.5	Optimizacija početnica za qPCR.....	47
3.3.6	Provjera DNA na agaroznom gelu.....	48
3.4	Analiza ekspresije proteina.....	48
3.4.1	Izdvajanje proteina iz stanica.....	48
3.4.2	Mjerenje koncentracije proteina.....	49
3.4.3	Detekcija proteina westernskom metodom otiska.....	49
3.5	Analiza autofagije.....	51
3.6	Protočna citometrija.....	51
3.6.1	Analiza staničnog ciklusa.....	51
3.6.2	Analiza aktivnosti signalnih puteva PI3K/MAPK.....	52
3.7	Imunofluorescentno bojanje stanica.....	53
3.8	Nativna kromatinska imunoprecipitacija uz sekvenciranje.....	55
3.8.1	Validacija protutijela.....	56
3.8.2	Fiksacija stanica i digestija kromatina.....	57
3.8.3	Imunoprecipitacija kromatina.....	58
3.8.4	Priprema biblioteka DNA za sekvenciranje nove generacije.....	59
3.8.5	Bioinformatička analiza rezultata ChIP-seq.....	61
3.9	Statistička obrada podataka.....	62
4.	REZULTATI.....	63
4.1	Karakterizacija i odabir staničnih linija melanoma.....	64
4.1.1	Genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI.....	64
4.1.2	Ekspresija proteina signalnog puta HH-GLI.....	66
4.1.3	Odgovor staničnih linija melanoma na inhibiciju HH-GLI.....	67
4.2	Optimizacija parametara i validacija reakcije ChIP-seq.....	68
4.3	Analiza rezultata ChIP-seq.....	70
4.3.1	Odabir transkripcijskih meta proteina GLI za daljnju validaciju.....	76
4.4	Validacija odabranih ciljnih gena.....	77

4.4.1 Validacija transkripcijskih meta koje kodiraju za proteinske produkte .....	77
4.4.2 Validacija transkripcijskih meta koje kodiraju za lncRNA .....	81
4.4.3 Validacija transkripcijskih meta koji kodiraju za miRNA .....	82
4.5 Uspostava staničnih linija rezistentnih na GANT61 .....	87
4.5.1 Validacija uspostavljenih staničnih linija rezistentnih na GANT61 .....	87
4.5.2 Morfologija rezistentnih staničnih linija .....	90
4.5.3 Profil genske ekspresije u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama .....	91
4.5.4 Analiza profila ekspresije proteina u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama .....	93
4.5.5 Sposobnost formiranja kolonija u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama ...	95
4.5.6 Sposobnost migriranja u rezistentnim staničnim linijama .....	98
4.5.7 Analiza aktivnosti signalnog puta RAS/RAF/MAPK u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama.....	102
4.5.8 Analiza staničnog ciklusa u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama .....	104
4.6 Analiza gena identificiranih analizom CHIP na uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama.....	108
4.6.1 Ekspresija proteina RAB34 u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama ...	110
4.6.2 Imunofluorescentna vizualizacija primarnih cilija .....	111
4.6.3 Analiza autofagije u rezistentnim staničnim linijama .....	114
5. RASPRAVA .....	117
6. ZAKLJUČCI .....	130
8. SAŽETAK .....	153
9. SUMMARY .....	154
10. ŽIVOTOPIS.....	155

# 1. UVOD

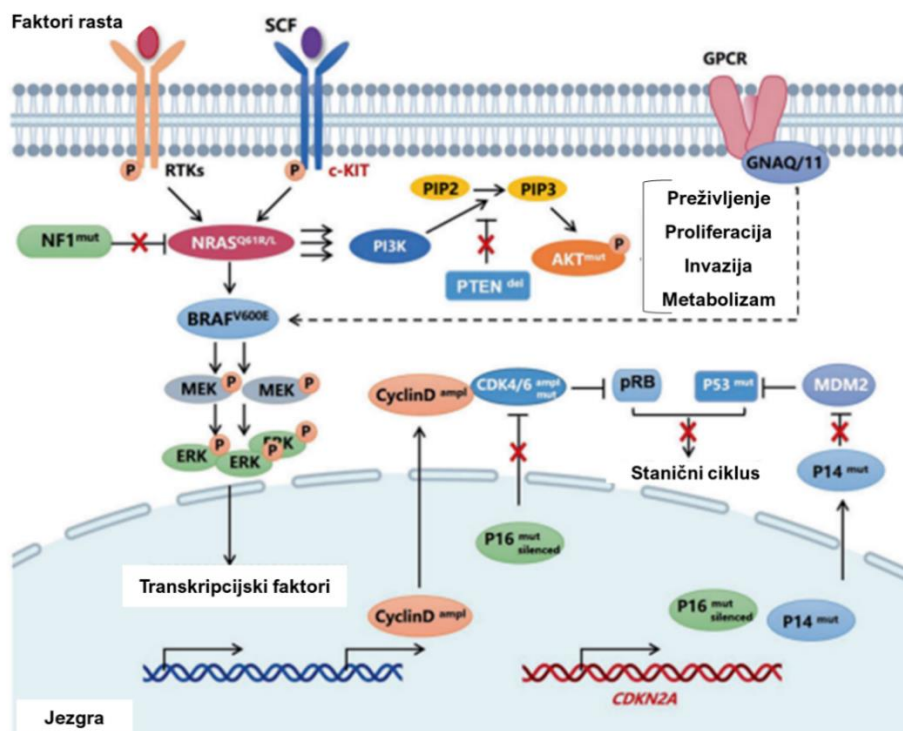
## 1.1 Melanom kože

Melanom predstavlja karcinom kože s najvećom smrtnošću. Do razvoja melanoma dolazi u melanocitima, stanicama neuroektodermalnog porijekla koje tijekom razvoja sisavaca migriraju u različite dijelove tijela poput kože, sluznice i unutarnjeg uha gdje proizvode pigment melanin koji štiti stanice od oštećenja izazvanim ultraljubičastim (UV) zračenjem (1). Zbog široke distribucije melanocita, melanom može nastati bilo gdje u tijelu, neovisno o anatomskoj lokaciji i tipu organa, odnosno, tkiva. Pojavnost melanoma kože razlikuje se među geografskim regijama, te ovisi o kliničkom fenotipu, genetičkoj predispoziciji pojedinca te učestalosti izlaganja UV zračenju (2). Učestalo izlaganje UV zračenju može uzrokovati promjene u molekuli DNA, dovesti do akumulacije reaktivnih kisikovih vrsta te upalnih procesa koji uključuju infiltraciju makrofaga i neutrofila, što u konačnici može dovesti do maligne transformacije melanocita (3). Pojedinci s velikim brojem nevusa, svijetle puti i boje očiju te ljudi koji se akutno izlažu djelovanju UV-a najviše su podložni razvoju melanoma kože. Za razliku od ostalih solidnih tumora, melanom kože najčešće se javlja kod mlađe populacije te onih srednjih godina (4). Prema podacima Hrvatskog Zavoda za javno zdravstvo, u 2019. godini u Hrvatskoj je od melanoma oboljelo 520 muškaraca i 384 žena, što predstavlja oko 4% svih malignih oboljenja, i po učestalosti je osmo najčešće maligno oboljenje u Hrvatskoj (5). Ovisno o stadiju razvoja melanoma, stopa preživljenja pacijenata bitno se razlikuje. Zahvaljujući ranoj dijagnozi pacijenti u ranim stadijima melanoma imaju stopu preživljenja preko 80 %, dok petogodišnja stopa preživljenja pacijenata s metastazama jedva prelazi 20 % (6).



**Slika 1.1** Učestalost mutacija gena ključnih za razvoj melanoma kože prema TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (7).

Klinički, melanom se klasificira u četiri glavna tipa na temelju histopatoloških karakteristika: superficijalni melanom, nodularni melanom, lentigo maligni melanom te akralni melanom. Razvoj melanoma definira se stupnjevanjem TNM (eng. *Tumour Node Metastasis*) gdje se prati veličina tumora (oznaka T), prisutnost stanica u limfnim čvorovima (oznaka N) te pojava udaljenih metastaza (oznaka M) (8). Na molekularnoj razini, melanomi sadrže mnoge genske promjene koje mijenjaju aktivnost mnogih signalnih puteva. Melanom kože može nastati iz benignih nevusa ili *de novo*, te može imati nasljednu podlogu ili biti sporadične prirode. Kao glavne molekularne značajke nasljednog melanoma ističu se gubitak funkcije tumorskog supresora *CDKN2A* (eng. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*), te mutacije u genima *CDK4* (eng. *Cyclin Dependent Kinase 4*), *MITF* (eng. *Melanocyte Inducing Transcription Factor*) te *BAP1* (eng. *BRCA1 Associated Protein 1*) (9). Najučestalije mutacije u melanomu zabilježene su u genima *BRAF* (eng. *B-Raf Proto-Oncogene*) (40%), *NRAS* (eng. *NRAS Proto-Oncogene*) (20%) te *KIT* (eng. *KIT Proto-Oncogene*) (15%) (Slika 1.1). *BRAF* i *NRAS* su dio signalnog puta RAS/RAF/MAPK koji predstavlja signalni put koji je najviše promijenjen u melanomu. U slučaju gena *BRAF* najčešće se radi o supstituciji jednog nukleotida u kodonu 600 koja uzrokuje zamjenu aminokiseline valin glutaminskom kiselinom (*BRAF V600E*). U genu *NRAS* najčešće dolazi do mutacija u kodonima 12, 13 te 61 (10). U oba slučaja, mutacije uzrokuju konstitutivnu aktivaciju signalnog puta RAS/RAF/MAPK čime su promijenjeni osnovni stanični procesi poput proliferacije, preživljenja i migracije stanica (11).

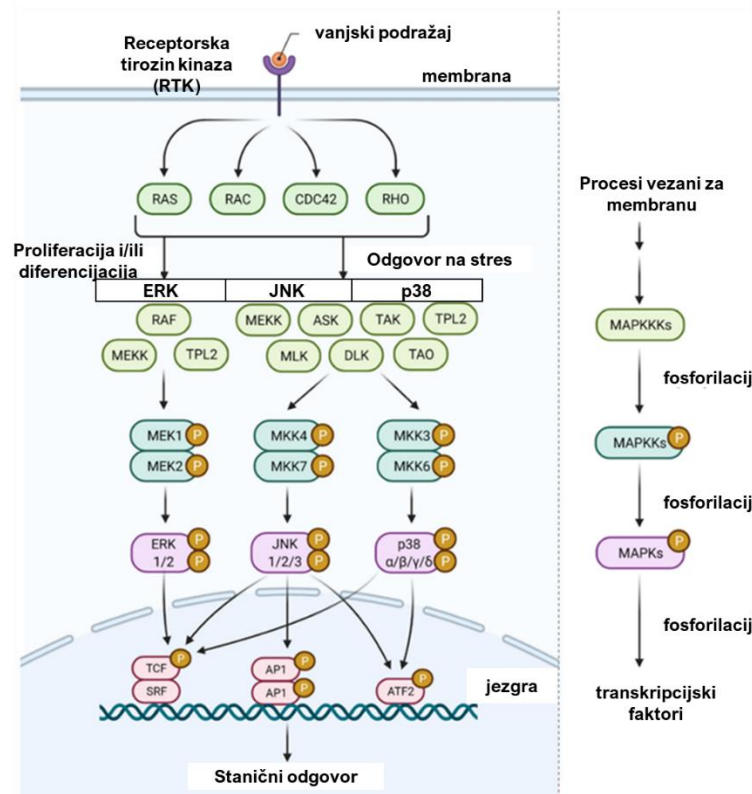


**Slika 1.2** Prikaz glavnih signalnih puteva koji su najčešće promijenjeni u melanomu, signalni putevi RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT te CDKN2A (12).

Osim signalnog puta RAS/RAF/MAPK, važnu ulogu u progresiji melanoma imaju i signalni putevi PI3K/AKT, WNT, NFκB te HH-GLI (Slika 1.2). Bolje razumijevanje signalnih puteva koji su deregulirani u melanomu dovelo je do razvoja novih terapijskih pristupa. Kirurško odstranjivanje primarnog melanoma predstavlja najučestaliji i najsigurniji način liječenja, no u slučaju metastaza takav pristup je često onemogućen. Zbog relativno slabog odgovora metastaza na standardnu radioterapiju i kemoterapiju, zadnjih godina fokus je stavljen na razvoj imunoterapije te ciljanih lijekova (13). S obzirom na to da su mutacije u genu *BRAF* jedna od glavnih značajki melanoma, ne iznenađuje činjenica da je upravo protein BRAF meta velikog broja lijekova u upotrebi. Najčešće se koriste kombinacije lijekova koji inhibiraju mutirani protein BRAF poput vemurafeniba, dabrafeniba te enkorafeniba s inhibitorima kinaza MEK, poput trametiniba, kobimetiniba ili binimetiniba (14,15). Osim ciljanih lijekova isprva je, značajan napredak u liječenju metastatskog melanoma imao razvoj imunoterapije, neutralizirajućih protutijela inhibitornih receptora imunskog odgovora poput CTLA-4 i PD1 (16). Nažalost, učinak trenutne terapije pokazao se kratkog vijeka jer ubrzo nakon primjene lijeka dolazi do relapsa bolesti zbog razvoja rezistencije na terapiju (17). Kako bi se unaprijedila trenutna terapija, radi se na razvoju kombinirane terapije koja uključuje ciljanje signalnih puteva koji su u interakciji s RAS/RAF/MAPK, reprogramiranju imunskog odgovora te otkrivanju ranih biljega melanoma (10). O molekularnim mehanizmima koji su odgovorni za fenomen otpornosti stanica na terapiju te kako ih potencijalno zaobići biti će više riječi u Poglavlju 1.6.

## 1.2 Signalni put RAS/RAF/MAPK

Priča o signalnom putu RAS/RAF/MAPK započela je prije više od 30 godina kada su znanstvenici Strugill i Ray otkrili protein s kinaznom aktivnošću u adipocitima koji se aktivira dodatkom inzulina (18). Daljnjim analizama utvrđeno je da je protein sličan prethodno opisanim proteinima čija je kinazna aktivnost stimulirana faktorima rasta te je dobio ime MAP (eng. *Mitogen Activated Protein*) (19). Ubrzo nakon toga su identificirane i brojne druge komponente signalnog puta. Onda je signalni put RAS/RAF/MAPK pobudio veliki interes znanstvene zajednice jer se ubrzo uvidjelo da se radi o evolucijski značajno konzerviranom putu važnom u staničnoj regulaciji. Danas je poznato da se signalni put aktivira vezanjem širokog spektra liganada koji mogu biti faktori rasta, kemokini, hormoni te patogeni poput bakterija i virusa (Slika 1.3). Ovisno o tipu liganda koji se veže na receptorsku tirozin kinazu (RTK eng. *Receptor Tyrosine Kinase*), mogu se aktivirati različiti krakovi signalnog puta, krakovi ERK, JNK ili p38. Naziv RAS/RAF/MAPK se često koristi kao sinonim za krak ERK jer je upravo taj krak dominantno povezan s malignom transformacijom stanica.

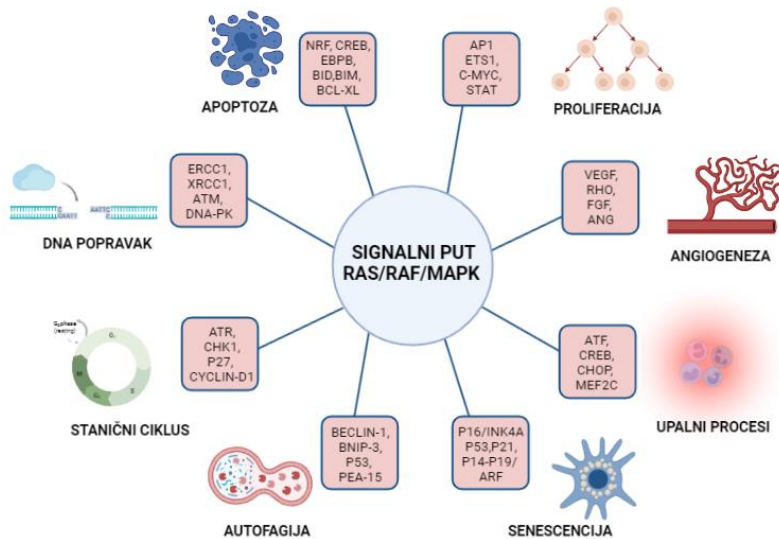


**Slika 1.3** Shematski prikaz signalnog puta RAS/RAF/MAPK. Vežanjem širokog spektra liganada, mogu se aktivirati različiti krakovi signalnog puta, ERK, JNK te p38 koji aktiviraju svoje nizvodne mete među kojima su mnoge transkripcijski faktori (20).

Krak ERK najčešće aktiviraju različiti faktori rasta, dok se krakovi JNK i p38 aktiviraju stresnim signalima kao što su patogeni i proupalni citokini (20). Vežanjem liganada, dolazi do aktivacije citoplazmatske domene receptora i fosforilacije tirozinskih ostataka čime je omogućeno vezanje adaptorskih proteina koji služe za vezanje daljnjih efektora. U slučaju kraka ERK, radi se o proteinima GRB2 (eng. *Growth Factor Receptor Bound Protein*) i SOS (eng. *SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor*) koji omogućavaju vezanje GTPaze RAS (KRAS, NRAS ili HRAS) (21). Uslijed vežanja, omogućena je izmjena GDP-GTP na proteinu RAS, te on kao takav može dalje aktivirati protein RAF (CRAF, BRAF, ARAF). U konačnici, protein RAF aktivira dvojno specifične kinaze MEK1 i MEK2 koje aktiviraju kinaze MAPK, ERK1 i ERK2 fosforilirajući njihove tirozinske i treoninske aminokiselinske ostatke (22). Kinaze ERK djeluju na svoje nizvodne mete među kojima su brojni transkripcijski faktori koji kontroliraju esencijalne stanične procese poput proliferacije, preživljenja, migracije, metaboličkih procesa te epitelno-mezenhimalne tranzicije (eng. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) (23). Važnost signalnog puta RAS/RAF/MAPK u kontroli navedenih procesa u zdravom organizmu dobro je opisana. Tijekom embrionalnog razvoja bitan je za normalno formiranje udova i mozga time što regulira populaciju progenitorskih stanica (24,25). U odraslom organizmu, kinaze ERK reguliraju preživljenje miocita i hipokampalnih neurona



sprječavajući njihovu apoptozu uslijed oksidacijskog stresa. Isto tako, pokazano je da inhibicija ovog signalnog puta inducira apoptozu u epitelnim stanicama bubrega i T-limfocitima (26–29). U raku signalni put RAS/RAF/MAPK vrlo je često poremećen te su procesi pod kontrolom ovog signalnog puta modificirani tako da rade u korist tumorskih stanica (Slika 1.4).



**Slika 1.4** Uloga signalnog puta RAS/RAF/MAPK u procesima koji su promijenjeni u karcinogenezi (shema izrađena pomoću platforme BioRender <https://app.biorender.com>).

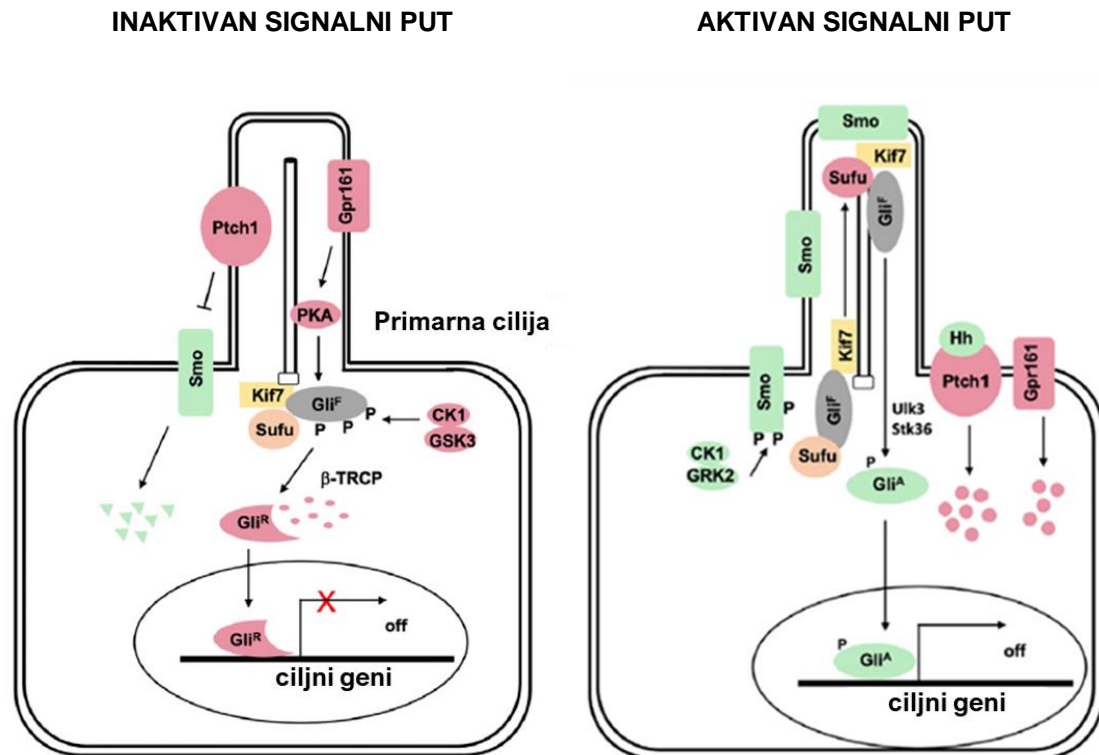
Kao što je spomenuto u prethodnom poglavlju, mutacije onkogene *RAS* i *RAF* najučestalije su promjene signalnog puta RAS/RAF/MAPK. Smatra se da čak 30% svih tumora nosi amplifikaciju ili neku mutaciju u genu *RAS* (30). Mutacije u genu *BRAF* također su prisutne u različitim tipovima tumora: melanomu (do 50%), raku štitnjače (40%), raku debelog crijeva (20%) te raku jajnika (30%) (31). *BRAF* promovira maligni fenotip melanocita kroz fosforilaciju ovisnu o ERK transkripcijskog faktora MITF koji, kontrolirajući proteine BCL-2 (eng. *BCL2 Apoptosis Regulator*) i CDK2 (eng. *Cyclin Dependent Kinase 2*), potiče preživljenje transformiranih stanica (32). U određenim tipovima tumora, RAS/RAF/MAPK modulira i ekspresiju proteina koji djeluju kao protonske pumpe te tako regulira razvoj otpornosti na lijekove (33). Također, kinaze ERK reguliraju ekspresiju metaloproteinaza matriksa (eng. *matrix metalloproteinase*, MMP) te tako direktno kontroliraju invaziju tumorskih stanica (34). Regulirajući ekspresiju interleukina IL-6 i IL-10 kontroliraju aktivnost i infiltraciju imunskih stanica u tumoru (35). Utišavanje ekspresije *BRAF* u melanomu uporabom molekula interferirajućih RNA inhibira signalni put RAS/RAF/MAPK, potiče apoptozu i gubitak transformiranog fenotipa stanica (36). RAS/RAF/MAPK je u interakciji s brojnim drugim signalnim putevima kao što su PI3K/AKT, WNT, TGF- $\beta$  i HH-GLI što čini regulaciju staničnih procesa još složenijom. U Poglavlju 1.4 opisana je interakcija signalnog puta RAS/RAF/MAPK i HH-GLI koja je u sklopu ovog doktorskog rada od osobite važnosti.

## 1.3 Signalni put Hedgehog-GLI

### 1.3.1 Kanonski prijenos signala

Signalni put Hedgehog-GLI (HH-GLI) otkriven je prije 35 godina zahvaljujući znanstvenicima Nusslein-Volhard i Wieschaus koji su proučavali embrionalni razvoj vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Prva opisana komponenta bio je ligand HH (eng. *Hedgehog*) nakon što je uočeno da mutacija u ovom genu remeti segmentaciju tijela ličinke vinske mušice i uzrokuje pojavu "bodlji" nalik onima kod ježa (37). Molekularna karakterizacija liganda HH uslijedila je 12 godina nakon i pokazala da se radi o sekretornom proteinu koji djeluje kao morfogen (38). Ubrzo nakon toga otkrivena su tri homologa liganda HH kod sisavaca, SHH (eng. *Sonic Hedgehog*), IHH (eng. *Indian Hedgehog*) te DHH (eng. *Desert Hedgehog*). Ostale komponente, receptor PTCH (eng. *Patched*) te koreceptor SMO (eng. *Smoothed*) otkrivene su u sličnim studijama te su nazive dobili kao i ligand HH, na temelju fenotipskih promjena koje njihove mutacije uzrokuju u izgledu krila vinske mušice. Krajem 1980tih otkriveni su proteini GLI nakon što je ustanovljeno da je gen *GLI1* višestruko amplificiran u malignim gliomima (39). Ubrzo nakon otkrića proteina GLI2 i GLI3, opisana je i njihova funkcija transkripcijskih faktora (40,41). Početkom 21. stoljeća rekonstruirana je evolucijski konzervirana signalna kaskada HH-GLI kakvu danas poznajemo i krenuo je val istraživanja o fiziološkim učincima ovog signalnog puta kod sisavaca. Kanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI ovisi o dostupnosti liganda HH (Slika 1.5). U slučaju odsutnosti liganda HH, receptor PTCH1 u primarnoj ciliji inhibira koreceptor SMO (42). Mehanizam inhibicije koreceptora SMO receptorom PTCH1 još je uvijek nepoznanica. Postoji hipoteza da PTCH1 indirektno sudjeluje u lučenju ili transportu endogenih sterolnih inhibitora koreceptora SMO, dok neki smatraju da je kolesterol ključan za aktivaciju SMO (43,44). Zbog inhibicije koreceptora SMO, sprječena je njegova akumulacija u primarnoj ciliji te blokirana daljnji prijenos signala, zbog čega proteini GLI ostaju zarobljeni u citoplazmi u kompleksu s proteinom SUFU (eng. *Suppressor of Fused*). Vezanjem SUFU na proteine GLI, prekriva se vezno mjesto za transportni protein, importin Kap $\beta$ 2 (eng. *Transportin-1*) čime je onemogućena njihova translokacija u jezgru (45). Formiranjem kompleksa SUFU-GLI aktiviraju se kinaze: PKA (eng. *Protein kinase A*), CK1 (eng. *Casein kinase 1*) te GSK3 $\beta$  (eng. *Glycogen synthase kinase 3 beta*) koje fosforiliraju proteine GLI. Fosforilacijom, proteini GLI postaju supstrat za E3 ubikvitinsku ligazu,  $\beta$ TrCP (eng. *Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) koja na proteine GLI veže ubikvitin te ih tako obilježava za degradaciju u proteasomu. U slučaju proteina GLI1 razgradnja je potpuna, dok se proteini GLI2 i GLI3 cijepaju u skraćene forme. Skraćeni oblici proteina GLI2 i GLI3 djeluju kao transkripcijski represori, te ih u tom obliku označavamo kao GLI2R i GLI3R (46,47). Uslijed vezanja liganda HH, dokida se inhibicija receptora PTCH1 na koreceptor SMO, čime dolazi do njegove akumulacije u primarnoj ciliji i transdukcije signala u

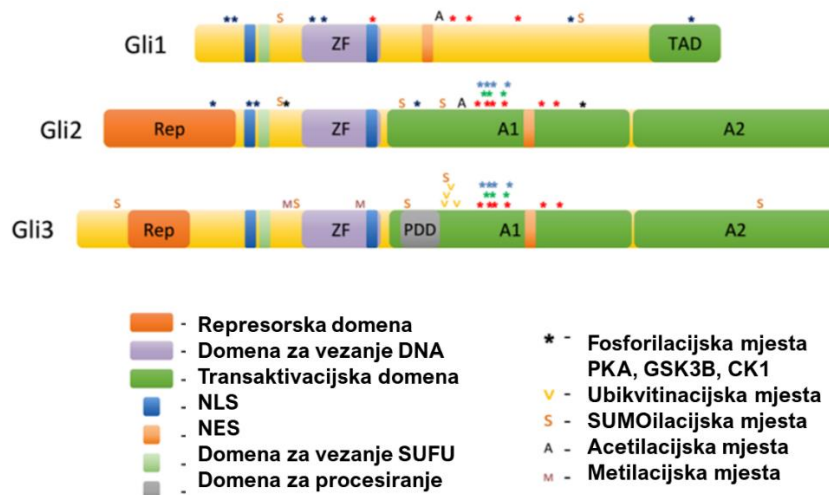
citoplazmu. U tom slučaju, kinaza GSK3 $\beta$  fosforilira protein SUFU umjesto proteina GLI te time potiče njihovo razdvajanje iz kompleksa SUFU-GLI (48). Proteini GLI se u nepocijepanom obliku translociraju u jezgru pomoću importina Kap $\beta$ 2 gdje se vežu za promotore ciljnih gena koji kontroliraju niz staničnih procesa poput proliferacije, staničnog ciklusa, apoptoze, epitelno-mezenhimalne tranzicije, autofagije i adhezije (49). O ulozi primarne cilije u aktivaciji signalnog puta HH-GLI biti će više riječi u Poglavlju 1.3.3.



**Slika 1.5** Shematski prikaz signalnog puta HH-GLI. Na lijevom dijelu prikazan je signalni put u inaktivnom stanju kada je ligand HH odsutan. U tom slučaju, receptor PTCH1 inhibira koreceptor SMO te posljedično, proteini GLI ostaju u citoplazmi u kompleksu s proteinom SUFU te bivaju obilježeni za proteasomsku razgradnju. Cijepanjem nastaju skraćeni oblici proteina GLI koje djeluju kao transkripcijski represori. Signalni put aktivira se vezanjem liganda HH čime se dokida inhibicija koreceptora SMO receptorom PTCH1 (desno). Uslijed dokidanja inhibicije SMO, dolazi do transdukcije signala, oslobođenja proteina GLI1-3 iz kompleksa s proteinom SUFU koji se nepocijepani translociraju u jezgru gdje potiču transkripciju ciljnih gena (50).

### 1.3.2 Transkripcijski faktori GLI

Proteini GLI predstavljaju glavne efektore signalnog puta HH-GLI. Kod sisavaca, razlikujemo tri proteina GLI: GLI1, GLI2 te GLI3 koji pripadaju obitelji transkripcijskih faktora GLI-Kruppel. Proteine iz te obitelji odlikuje prisutnost motiva cinkova prsta u domenama za vezanje uz DNA. Vezne domene pokazuju značajan stupanj homologije, te stoga proteini GLI međusobno imaju mnoge preklapajuće funkcije. Proteini GLI1 i GLI3 prepoznaju slijed 5'-GACCACCCA-3' u promotorskim regijama ciljnih gena, dok GLI2 prepoznaje veoma sličnu slijed 5'-GAACCACCCA-3' (40). Dok su vezne domene proteina evolucijski vrlo očuvane, građa njihovih terminalnih domena razlikuje se te zbog toga svaki protein GLI ima i svoje specifične jedinstvene funkcije (Slika 1.6). Proteini GLI2 i GLI3 posjeduju obje terminalne domene, transaktivirajuću i represorsku te stoga mogu djelovati na oba načina, dok proteinu GLI1 nedostaje represorska domena te djeluje sključivo kao aktivator signalnog puta. Blizu vezne domene proteina GLI, nalazi se domena koja determinira procesiranje proteina PDD (eng. *Processing determinant domain*) koja je u slučaju proteina GLI3 vrlo efikasna, te se zato protein GLI3 najčešće procesira u represorsku formu. Kod proteina GLI2, ta domena je zbog prisustva određenih aminokiselinskih ostataka manje učinkovita, zbog čega GLI2 dominantno ostaje u obliku aktivatorske forme pune duljine (51).

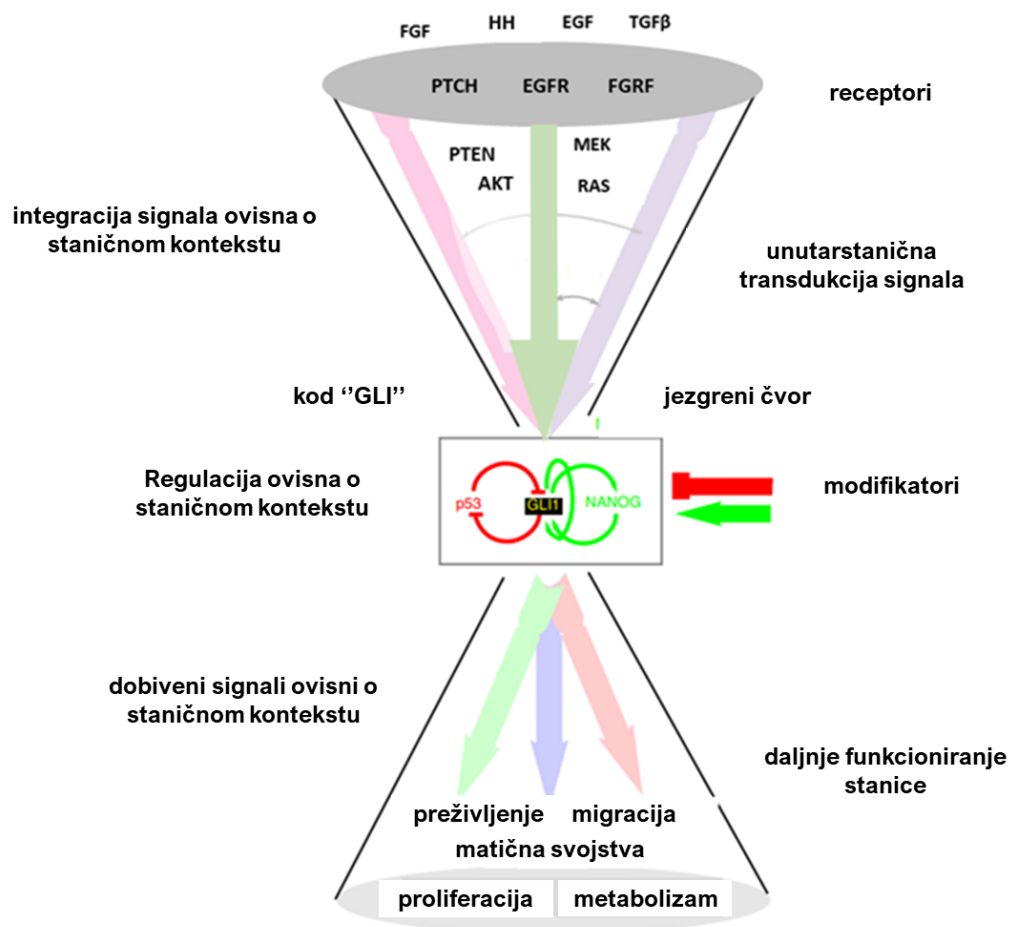


**Slika 1.6** Građa domena proteina GLI1, GLI2 i GLI3. Proteini GLI2 i GLI3 posjeduju obje terminalne domene, transaktivacijsku (zeleno) i represorsku (narančasto) te zato mogu djelovati na oba načina. Protein GLI1 nema represorsku domenu te stoga djeluje isključivo kao aktivator signalnog puta (51).

Aktivnost proteina GLI regulirana je na više razina, najčešće posttranslacijskim modifikacijama i regulatornim ko-proteinima. Na posttranslacijskoj razini, proteini GLI najčešće su regulirani fosforilacijom. Kao što je prethodno opisano, u odsustvu liganda proteine GLI fosforiliraju kinaze PKA, CK1 te GSK3 $\beta$  te tako održavaju signalni put inaktivnim (46). Mjesta fosforilacije

označena su na slici 1.6 zvjezdicama. Osim fosforilacije, od neizostavne važnosti je i ubikvitinacija kojom je regulirana proteasomalna razgradnja proteina. Protein GLI1 većinom se regulira na transkripcijskoj razini, te obično nije prisutan u stanicama s inaktivnim signalnim putem. Kao odgovor na aktivaciju signalnog puta, protein GLI2 potiče transkripciju ciljnih gena među kojima je i *GLI1* koji dalje amplificira efekt signalnog puta (52). Stupanjem u interakciju s drugim proteinima, bilo citoplazmatskim ili jezgrenim, transkripcijska aktivnost proteina GLI može se jako modificirati. Najpoznatiji primjer je prethodno opisani mehanizam represije preko proteina SUFU koji onemogućava translokaciju proteina GLI te njihovu transkripcijsku aktivnost (45). Neki proteini poput MIM (eng. *Missing in Metastasis*) te mTOR (eng. *Mammalian target of rapamycin*) mogu se vezati za kompleks SUFU-GLI te tako potaknuti njihovu disocijaciju i daljnu transkripcijsku aktivnost GLI (53). Također, proteini GLI u jezgri mogu stupiti u interakciju s drugim proteinima koji pospješuju njihovu transkripcijsku aktivnost. Histon acetiltransferaza PCAF (eng. *Lysine acetyltransferase 2B*), stupa u interakciju s proteinom GLI1 prilikom vezanja za promotor ciljnih gena kako bi održavala otvorenu konformaciju kromatina koja pogoduje jačoj transkripcijskoj aktivnosti (54). Posttranskripcijski, na razini mRNA, GLI1 može se modificirati deaminacijom nukleotida 2179 koja uzrokuje promjenu aminokiselinskog slijeda u domeni za vezanje SUFU. U tom slučaju, protein GLI1 pokazuje manji odgovor na negativnu regulaciju od strane SUFU. Takav mehanizam obrade transkripta *GLI1* uočen je u mijelomima i leukemiji te pridonosi malignim karakteristikama (55). Istraživanja na početku 21. stoljeća uglavnom su bila fokusirana na pojedini protein GLI, osobito GLI1 koji je oduvijek plijenio posebnu pozornost među znanstvenicima zbog karakteristike isključivog aktivatora. Takav trend istraživanja trajao je dok se u HH-GLI zajednici nije uveo pojam "kôd GLI" (56). Kôd GLI označava ukupnu interakciju među proteinima GLI, odnosno aktivatorskih i represorskih formi koja u konačnici stvara spektar transkripcijskih odgovora koji su veoma ovisni o staničnom kontekstu. Važnost staničnog konteksta u kôdu GLI potvrdilo je istraživanje u kojem se pratila aktivnost proteina GLI tijekom embrionalnog razvoja. Ovisno o tipu tkiva, odnos proteina GLI razlikovao se, kao i njihova aktivnost, odnosno udio aktivatorskih i represorskih formi. Upravo je stanični kontekst potencijalni razlog mnogih kontradiktornih rezultata na temu aktivnosti proteina GLI. Kompleksnost kôda GLI može se jednostavno sažeti sljedećim primjerima: protein GLI3 može regulirati različite setove gena ovisno o tome je li eksprimiran bez ili s proteinom GLI1, kao što kooperacija proteina GLI2 i GLI3 može imati suprotan efekt na regulaciju aktivnosti GLI1 u usporedbi sa samostalnom regulacijom putem proteina GLI3 (56). Stvar daleko složenijom čini interakcija signalnog puta HH-GLI s drugim signalnim putevima koji stvaraju signale koji modificiraju kôd GLI (Slika 1.7). Ovisno o staničnom kontekstu, neki signalni putevi reguliraju HH-GLI pozitivno, dok neki pokušavaju utišati njegovu aktivnost. U konačnici sve interakcije rezultiraju regulacijom ciljnih gena koji vrše promjene u staničnim procesima poput

proliferacije, preživljenja, metabolizma te migracije (57). Da bi se proteini GLI te uloga kôda GLI bolje opisala u kontekstu funkcije u stanici, nužno je identificirati te proučavati njihove ciljne mete. Poznato je da proteini GLI reguliraju ekspresiju gena koji su uključeni u čitav spektar staničnih procesa poput diferencijacije i proliferacije (*CCND1*, *CCNDE*, *E2F1*, *N-MYC*, *FOXM1*, *PDGFR $\alpha$* ), preživljenja (*BCL2*), samoobnavljanja (*SOX2*, *NANOG*, *BMI1*), angiogeneze (*VEGF*, *CYR61*, *ANG1/2*), epitelno-mezenhimalne tranzicije (*SNAIL1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST2*, *MMP9*) te invazije (*OPN*).



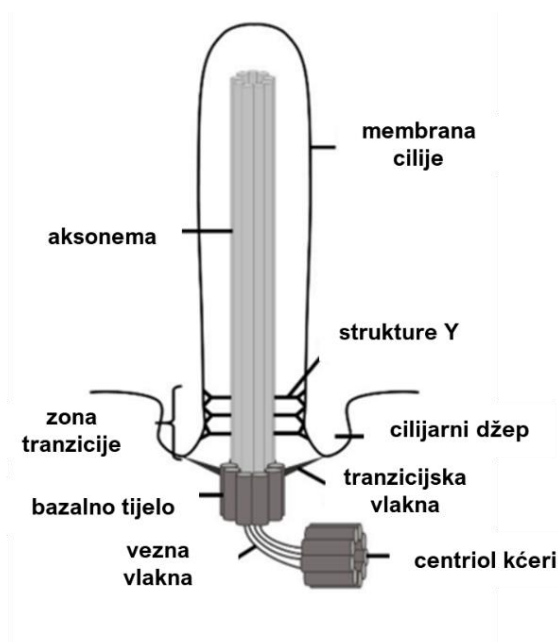
**Slika 1.7** Model regulacije kôda GLI. Signalni put HH-GLI prima mnoge signale od ostalih puteva prijenosa poput RAS/RAF/MAPK i PI3K/AKT zajedno s drugim modulatorima poput p53 i NANOG modificiraju kôd GLI te reguliraju aktivnost gena uključenih u osnovne stanične procese (57).

Među ciljnim metama signalnog puta HH-GLI nalaze se i same njegove komponente GLI1, PTCH1 i HHIP1 (eng. *Hedgehog interacting protein 1*) kojima se uspostavlja autoregulacija puta prijenosa (49). Identificirani ciljni geni kodiraju za proteinske produkte, no za regulaciju staničnih procesa važni su i nekodirajući genski produkti poput miRNA (eng. *Micro RNA*) te

lncRNA (eng. *Long noncoding RNA*). miRNA na posttranskripcijskoj razini vrše represiju vežući se na mRNA ciljnih gena, dok lncRNA služe kao molekularne “spužve” koje odvlače miRNA od njihovih ciljnih meta. Trenutno nema znanstvenih radova o potencijalnim nekodirajućim ciljnim genima proteina GLI. Zato metode poput native kromatinske imunoprecipitacije uz sekvenciranje (ChIP-seq eng. *Chromatin Immunoprecipitation sequencing*), koje mogu identificirati potencijalne kodirajuće i nekodirajuće ciljne mete, imaju osobitu važnost u istraživanju transkripcijskih faktora poput proteina GLI.

### 1.3.3 Primarna cilija

Primarna cilija solitarna je organela duljine 1–15  $\mu\text{m}$  građena od tri komponente: aksoneme, mikrotubularne srži koja sa stanične površine raste u ekstracelularni prostor, bazalnog tjelešca, strukture građene od centriola te zone tranzicije (Slika 1.8). Iako je struktura primarne cilije danas vrlo dobro opisana, i dalje je predmet mnogih istraživanja. Prva saznanja o primarnoj ciliji datiraju iz 19. stoljeća kada su rađena istraživanja na morskim svitkocima (58). Sredinom 20. stoljeća zbog razvoja elektronske mikroskopije, primarna cilija dobiva osobitu pozornost u znanstvenoj zajednici. Otkrićem intraflagelarnog transporta (IFT) kod zelene alge *Chlamydomonas*, te njegove uloge u integritetu primarne cilije, počele su spekulacije o tome kako defekti u strukturi primarne cilije mogu biti povezani s različitim bolestima (59). Početkom 21. stoljeća Pazour i suradnici prvi su put demonstrirali na mišjem modelu policističnih bubrega da je primarna cilija povezana s bolestima kod ljudi (60).



**Slika 1.8.** Građa primarne cilije. Primarna cilija sastoji se od tijela, aksoneme koju gradi 9 parova mikrotubula u formaciji prstena, bazalnog tjelešca građenog od centriola te zone tranzicije u proksimalnom dijelu aksoneme koja sadrži strukture, veze Y (62).

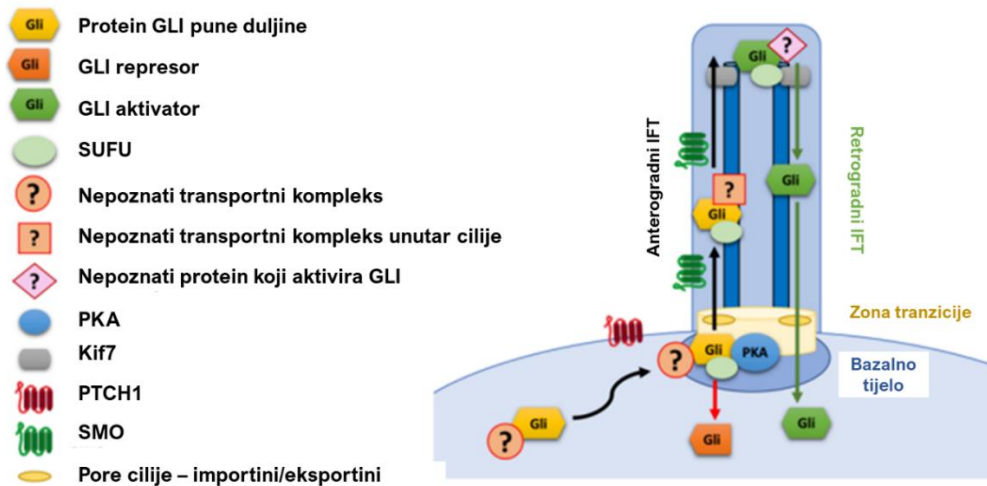
Nakon tog otkrića, brojne studije pokazale su povezanost različitih bolesti poput pretilosti, mentalne retardacije te tumora s defektima primarne cilije. Samim tim došlo je i do razvoja pojma "ciliopatija", bolesti povezanih s defektima u strukturi primarne cilije (61). Danas se zna da je primarna cilija senzorna organela koja prima vanjske podražaje nužne za aktivaciju mnogih signalnih puteva, te je zato njeno pravilno formiranje od iznimne važnosti za normalno funkcioniranje takvih puteva prijenosa. Aksonema kao struktura koja je građena od 9 parova mikrotubula posloženih u formaciji prstena, stabilizira ciliju te je neophodna za intraflagelarni transport. Intraflagelarnim transportom proteini se prenose od baze do vrha cilije (anterogradni IFT) te natrag prema bazi cilije (retogradni IFT). Za prijenos proteina potrebni su motorni proteini, kinezin-2, dinein-2 te takozvani proteini IFT (63). Protein koji se prenosi prvo se veže za proteine IFT u bazi cilije, te proteini IFT potom stupaju u interakciju s motornim proteinima koji se kreću duž mikrotubula aksoneme. U zoni tranzicije, regiji veličine 0,5  $\mu\text{m}$  u proksimalnom dijelu aksoneme, nalaze se takozvane strukture, veze-Y, koje kontroliraju ulazak i izlazak proteina u ciliju i izvan nje (64).

Osim što kontrolira transport proteina, primarna cilija regulira i brojne druge stanične procese poput staničnog ciklusa i autofagije. Veza između primarne cilije i staničnog ciklusa otkrivena je u ranim istraživanjima kada je opaženo da prije same mitoze dolazi do resorpcije primarne cilije (65). Razlog tome je što centrosom bazalnog tjelešca koji osim što tvori bazu primarne cilije, služi kao centar za organizaciju mikrotubula uključenih u formiranje diobenog vretena tijekom mitoze. Zato je prihvaćeno mišljenje da se ciliogeneza događa isključivo kada je centrosom slobodan, odnosno u fazi prije same diobe (fazama G0/G1). Ulaskom u fazu G2/M, dolazi do degradacije primarne cilije (66). Regulatori staničnog ciklusa poput proteina AURKA (eng. *Aurora kinase A*), PLK1 (eng. *Polo like kinase 1*) i NEK2 (eng. *NIMA related kinase 2*) sudjeluju u resorpciji cilije. AURKA fosforilira i aktivira histon deacetilazu HDAC6 (eng. *Histone deacetylase 6*) koja deacetilira supstrate aksoneme primarne cilije poput  $\alpha$ -tubulina čime dovodi do njene resorpcije (67). Interakcija primarne cilije i procesa autofagije dosta je kompleksna i kontroverzna. Tang i suradnici pokazali su da se važni cilijarni protein OFD1 (eng. *OFD1 centriole and centriolar satellite protein*), razgrađuje autofagijom nakon što se stanice izlože uvjetima izgladnjivanja čime se potiče formiranje cilija (68). Potpuno suprotno tome, druga grupa znanstvenika pokazala je da autofagija negativno regulira ciliogenezu tako što degradira OFD1 (69). Xu i suradnici, koristeći mišje embrionalne fibroblaste pokazali su da autofagija posredovana deacetilazom HDAC6 uzrokuje razgradnju motornih proteina primarne cilije IFT i KIF3 te redukciju ciliogeneze (70). Pampliega i suradnici otkrili su da se proteini esencijalni za autofagiju lokaliziraju u području primarne cilije gdje djeluju na supstrate koji mogu biti pozitivni ili negativni regulatori ciliogeneze. Regulacija ciliogeneze naposljetku ovisi o spektru supstrata koji se razgrađuju autofagijom (69).



Osim što regulira stanične procese, primarna cilija također služi kao medijator signalnih puteva, tako da prima signale iz ekstracelularnog prostora te istovremeno eksplicira na svojoj površini receptore nužne za primanje istih. Među signalnim putevima čija je aktivnost povezana s primarnom cilijom su signalni put WNT, PDGF te HH-GLI. Važnost cilije u normalnom funkcioniranju HH-GLI, pokazana je već u studijama embriogeneze miševa. Miševi s mutacijama komponenata IFT imali su abnormalnu morfologiju neuralne cijevi, fenotip karakterističan za deficijentnu aktivnost HH-GLI (71). Daljnja istraživanja pokazala su da su proteini IFT nužni za potpunu aktivaciju i represiju proteina GLI nakon odgovora na ligande HH. (72). Negativna regulacija proteina GLI ovisi o primarnoj ciliji jer se negativni regulatori SUFU i PKA transportiraju u ciliju gdje vrše svoju funkciju (73). Gubitak funkcije SUFU, omogućava transkripciju ciljnih gena proteina GLI neovisno o primarnoj ciliji (74). Mehanizam transporta proteina GLI u primarnu ciliju i dalje nije u potpunosti objašnjen. Proteini GLI veliki su proteini koji sporo difundiraju, a ulazak proteina u primarnu ciliju između ostalog je pod kontrolom difuzne barijere. Transport proteina GLI u primarnu ciliju mora imati tri koraka: ciljani transport u bazu primarne cilije, kontrolirani ulazak u ciliju preko difuzijske barijere te aktivni transport prema vrhu cilije (75). Malo je poznato o tome kako se proteini GLI transportiraju do baze cilije, no smatra se da se mehanizam razlikuje od onoga kod receptora PTCH1 i koreceptora SMO. Transport preko difuzijske barijere u zoni tranzicije temelji se na prolasku proteina kroz pore prema veličini. Mali proteini mogu proći pasivnom difuzijom, dok veći proteini prolaze aktivnim prijenosom (76). Smatra se da su za aktivni prijenos proteina GLI odgovorni proteini koji vrše i njihovu translokaciju u jezgru, poput importina Kap $\beta$ 2 (Slika 1.9).

Delecija Kap $\beta$ 2 ne utječe na procesiranje proteina GLI3 u represorsku formu, što potencijalno znači da GLI3 ne zahtijeva jednak prelazak preko difuzijske barijere poput proteina GLI1 i GLI2 (77). Kada proteini GLI prođu difuzijsku barijeru, akumuliraju se u ciliji. Za daljnji transport duž aksoneme odgovoran je motorni protein Kif7, za kojeg se smatra da reorganizira mikrotubule duž aksoneme te zato omogućava prijenos proteina GLI do vrha cilije (78). Nedavne studije pokazuju da za razliku od ostalih komponenata, defekti u komponentama IFT nemaju učinak na akumulaciju koreceptora SMO. Smatra se da se SMO kreće difuzijom kroz membranu te da njegov afinitet vezanja za bazu cilije uvjetuje receptor PTCH1 (79). Istraživanja pokazuju da je primarna cilija nužna za normalno funkcioniranje HH-GLI, no još uvijek nije jasno predstavlja li promijenjena aktivnost HH-GLI direktnu ili indirektnu posljedicu defekata primarne cilije.



**Slika 1.9** Pretpostavljeni mehanizam transporta proteina GLI u primarnu ciliju (51).

S obzirom na uključenost primarne cilije u regulaciju signalnih puteva, nije iznenađujuća činjenica da se primarna cilija povezuje s tumorigenezom kroz brojne aspekte. Defekti u primarnoj ciliji mogu poremetiti stanični ciklus. Zato mnoge tumorske stanice koje pokazuju višu stopu proliferacije gube primarne cilije (80). Smatra se da faktori hipoksije poput transkripcijskih faktora HIF (eng. *Hypoxia inducible factor 1*) inaktiviraju pVHL, strukturnu komponentu cilije te tako onemogućavaju ciliogenezu (81). U stanju hipoksije, tumorske stanice metabolički se reprogramiraju preferirajući glikolizu koja nije ovisna o kisiku. Lee i suradnici pokazali su da gubitak funkcije primarne cilije uzrokuje disfunkciju mitohondrija što potpomaže proces glikolize u stanicama raka štitnjače (82). Gubitak cilija također je zabilježen u melanomu te je pokazano da gubitak cilija prati stupanj malignosti (83). Radford i suradnici pokazali su da deregulacija signalnog puta RAS/RAF/MAPK u karcinomu bubrega dovodi do gubitka primarne cilije, jer pretjerana aktivnost ERK1/2 uzrokuje njihovo skraćivanje (84). Iako se većinom gubitak ciliogeneze povezuje s protumorskim karakteristikama, postoji velik broj publikacija koje tvrde da ciliogeneza radi u prilog tumorskim stanicama u kontekstu održavanja populacije matičnih stanica, promocije angiogeneze te rezistencije na staničnu smrt (85,86). U ovim istraživanjima još je jednom vidljiva važnost staničnog konteksta te kako ovisno o njemu ciliogeneza može imati efekte dvojne prirode.

### 1.3.4 Uloga signalnog puta Hedgehog-Gli u embrionalnom razvoju i odraslom organizmu

Studije na vinskoj mušici koje su proveli znanstvenici Nusslein-Volhard i Wieschaus odmah su ukazale da signalni put HH-Gli ima određenu ulogu u embrionalnom razvoju. S obzirom na to da je signalni put evolucijski vrlo očuvan, veliki broj znanstvenika zanimala je uloga HH-Gli u razvoju sisavaca koja je potvrđena studijama morfogeneze kraniofacijalnog kompleksa mozga. Pokazano je da mutacija u genu *SHH* uzrokuje defekte u obrascu razvoja embrija koji

dovode do pojave holoprozencefalije i ciklopije. Kasnije studije potvrdile su da je HH-GLI esencijalan za normalan razvoj frontonazalnog i maksilarnog dijela glave. Čak i privremeni gubitak funkcije SHH uzrokuje teške defekte poput holoprosencefalije (87,88). Pored navedenog, SHH kontrolira simetriju tijela, razvoj udova, neuralne cijevi, malog mozga i kože. DHH je ključan za normalan razvoj testisa, a IHH za morfogenezu kostiju (89). Signalni put HH-GLI regulira i normalnu angiogenezu induciranjem lučenja proangiogenih faktora (VEGF, ANG1 i ANG2) u endotelnim stanicama i vezivnom tkivu (90). Brojna istraživanja pokazuju da je aktivnost signalnog puta HH-GLI u embrionalnom razvoju neophodna za normalnu organogenezu mnogih tkiva i organa. U razvoju jetre, HH-GLI ima esencijalnu ulogu u diferencijaciji hepatocita iz progenitorskih stanica (91). Nakupljanje proteina SMO i GLI2 u primarnoj ciliji je od iznimne važnosti za normalan razvoj gušterače (92). Ranakho-Santos i suradnici pokazali su da je SHH ključan za organogenezu gastrointestinalnog trakta kod sisavaca. Ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI mijenja se tijekom faza razvoja dojke te se na taj način održava homeostaza (93).

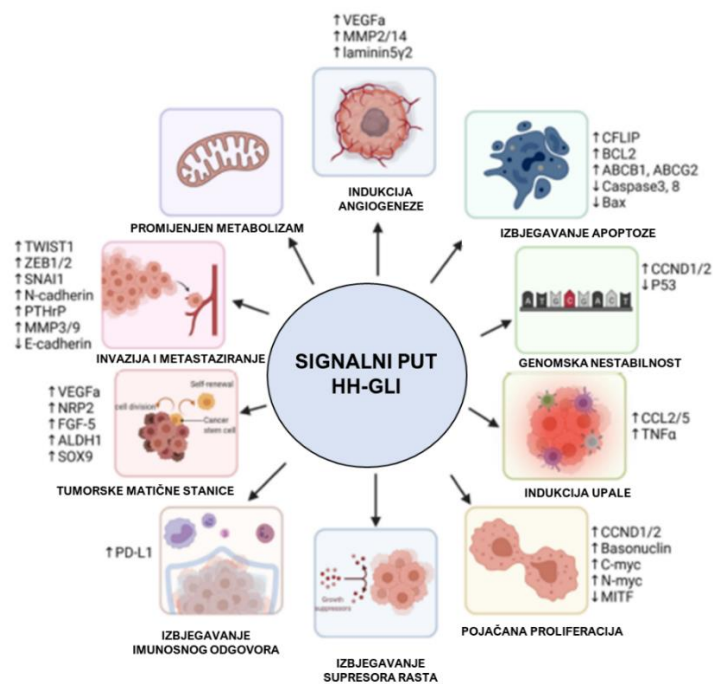
U odraslom organizmu, aktivnost signalnog puta utišana je te usmjerena na održavanje populacije somatskih matičnih stanica i saniranje ozljeda tkiva. Pokazano je da neuralne matične stanice reagiraju na SHH čime se potiče neurogeneza i regulira migracija neurona u odraslom mozgu (94). Aktivnost HH-GLI nužna je za regeneraciju jetre i crijevnog epitela (95,96). Ekspresija proteina PTCH1, SMO, GLI1 i GLI2 važna je u ranom razvoju folikula dlake te kontrolira njeno sazrijevanje (97). Aktivnost signalnog puta u folikulama dlaka nužna je također za aktivnost Merkelovih stanica koje kontroliraju razvoj epidermalnih senzornih struktura koje okružuju folikule (98). Osim populacije matičnih stanica raznih tkiva i organa, u odraslom organizmu, signalni put HH-GLI je isključivo aktivan u primarnim cilijama (99).

### **1.3.5 Uloga signalnog puta Hedgehog-GLI u karcinogenezi**

S obzirom na to da proteini GLI reguliraju esencijalne stanične procese poput embriogeneze, diferencijacije, regulacije matičnih stanica i proliferacije, nije teško za pretpostaviti da deregulacija HH-GLI ima veliku važnost u procesu karcinogeneze. Prva saznanja o ulozi signalnog puta HH-GLI u karcinogenezi krenula su opisivanjem Gorlinovog sindroma, rijetkog sindroma uzrokovanog mutacijom u tumorskom supresor genu *PTCH1*. Osim što oboljeli pojedinci imaju razvojne deformacije, karakterizira ih i učestalija pojava tumora poput bazocelularnog karcinoma, meduloblastoma, fibroma te rabdomiosarkoma (100).

Danas je poznato da regulirajući svoje ciljne mete, transkripcijski faktori GLI održavaju brojna temeljna obilježja karcinogeneze kao što su: poticanje proliferacije, utišavanje supresora rasta, blokiranje apoptoze, utišavanje imunskog odgovora, poticanje migracije i invazije stanica, angiogeneze te nestabilnosti genoma (Slika 1.10) (101). Transkripcijskom

regulacijom ciklina *CCND1* i *CCND2*, proteini GLI mogu poremetiti stanični ciklus tako da se kontrolne točke mitoze zaobiđu i uzrokuje nekontrolirana proliferacija stanica (102). Također, u prisustvu citotoksičnih spojeva, proteini GLI reguliraju anti-apoptotski gen *BCL2* čime se zaobilazi smrt stanica (103). Proteini GLI pojačavaju ekspresiju gena povezanih s invazijom te EMT stanica kao što su *MMP2* i *MMP9* (metaloproteinaze matriksa 2 i 9), *CDH2* (N-cadherin), *VIM* (vimentin) te *SNAI1* (eng. *Snail family transcriptional repressor 1*) (104). Stecca i suradnici pokazali su da HH-GLI regulira proliferaciju i preživljenje transformiranih melanocita te tako utječe na procese rasta, metastaziranja i relapsa bolesti. Eksperimenti na miševima demonstrirali su da se inhibicijom HH-GLI mogu modificirati navedeni procesi u melanomu (105). Pojačana aktivnost proteina GLI vrlo je često popraćena smanjenom ekspresijom čuvara genoma, *TP53*, čime je stanični ciklus dodatno poremećen te ugrožena genomska stabilnost (106). Das i suradnici su pokazali da GLI1 potiče transkripciju *SPP1* (osteopontin) u stanicama melanoma koji parakrino djeluje na okolne stanice te potiče njihovu proliferaciju i migraciju (107).



**Slika 1.10** Pojednostavljeni prikaz uloge signalnog puta Hedgehog-GLI u regulaciji osnovnih obilježja karcinogeneze (113).

Unutar svakog tumora postoji dio stanica koje imaju svojstva matičnih stanica. Takve stanice sporo se dijele, ali u određenim uvjetima mogu brzo proliferirati te stvoriti novu populaciju tumorskih stanica (108). Smatra se da HH-GLI regulira brojna svojstva matičnih stanica pojačavajući transkripciju gena uključenih u dediferencijaciju, samoobnavljanje i pluripotentnost čime se povećava karcinogeni potencijal stanica za inicijaciju melanoma (109).

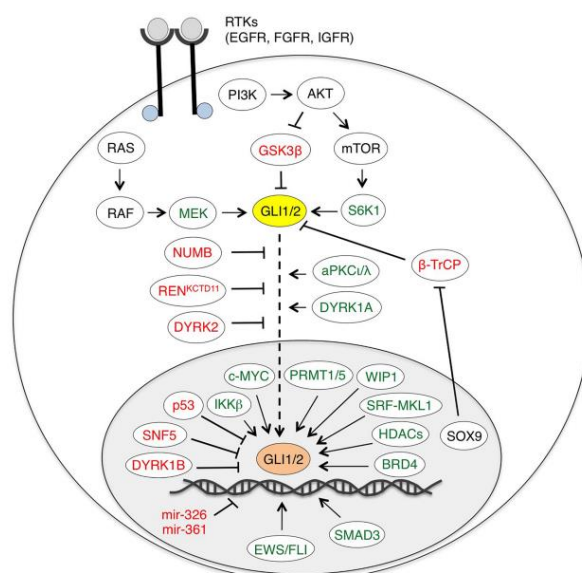
Aberantna aktivacija signalnog puta HH-GLI može biti uzrokovana različitim mehanizmima: mehanizmima ovisnim o ligandu HH, mehanizmima neovisnim o ligandu HH koji su rezultat nekanonske aktivacije signalnog puta, genetičkim promjenama komponenata HH-GLI te epigenetičkim mehanizmima (51,110). Aktivacija ovisna o ligandu može biti autokrina, parakrina te reverzno parakrina (111). U autokrinoj aktivaciji, tumorska stanica pojačano proizvodi te istovremeno veže ligand HH bez prisutnosti genetičkih promjena komponenata HH-GLI. Ovakav tip aktivacije zabilježen je u karcinomima epitelnog porijekla poput jajnika (110). U melanomu je pokazano da autokrina aktivacija HH-GLI uzrokuje pojačanu ekspresiju transkripcijskog faktora E2F1 (eng. *E2F transcription factor 1*) čime se potiče proliferacija i preživljenje maligno transformiranih stanica (112).

U parakrinoj aktivaciji, tumorske stanice proizvode ligand HH kojeg potom vežu stanice strome. Zauzvrat, stanice strome proizvode faktore rasta koji omogućavaju daljni rast tumorskih stanica. Ovakav tip aktivacije zabilježen je u tumoru prostate (114). Grund-Groschke i suradnici pokazali su da aktivacija HH-GLI u bazocelularnom karcinomu potiče stvaranje imunosupresivnog mikrookoliša u stanicama strome (115). U reverznoj parakrinoj aktivaciji, stanice strome proizvode ligand HH kojeg vežu tumorske stanice. U skvamoznom karcinomu usne šupljine pokazano je da fibroblasti služe kao izvor liganda HH za okolnu stromu i tumorske stanice (116). Mehanizmi aktivacije HH-GLI neovisni o ligandu rezultat su nekanonske interakcije s drugim signalnim putevima koji neovisno o membranskim uzvodnim komponentama HH-GLI djeluju direktno na proteine GLI. Nekanonska aktivacija HH-GLI biti će detaljno opisana u poglavlju 1.4. Genetičke modifikacije još su jedan od mehanizama koji može modificirati aktivnost HH-GLI. Amplifikacije gena *GLI1* u gliomima jedan su od mehanizama opisanih u ranijoj povijesti istraživanja signalnog puta (39). Učestale supstitucije c.576G > A u eksonu 5 gena *GLI1* također su zabilježene u karcinomu Merkelovih stanica (117). Nedavno istraživanje Dunjić i suradnika pokazalo je da polimorfizmi gena *GLI1* mogu služiti kao faktor predikcije razvoja melanoma i prognostički biljezi (118). Nasljedne mutacije *PTCH1* smatraju se odgovornima za razvoj sindroma nevoidnog bazocelularnog karcinoma, dok su somatske mutacije *PTCH1* pronađene u čak 30 % sporadičnih bazocelularnih karcinoma (119). Kod takvih pojedinaca vrlo su česte i mutacije u genu *SUFU* koje dovode do razvoja meduloblastoma u ranoj životnoj dobi (120). Mutacije *SMO* S278I i L412F koje uzrokuju konstitutivnu aktivaciju HH-GLI zabilježene su u sporadičnim meduloblastomima i meningiomima (121). Pojedinci oboljeli od blesti *Xeroderma pigmentosum* vrlo su često nositelji mutacija u genu *SHH* što ih čini podložnijim za razvoj bazocelularnog karcinoma (122). Epigenetički mehanizmi regulacije HH-GLI u kontekstu karcinogeneze također su opisani u brojnim publikacijama. Prekomjerna ekspresija *GLI3* uzrokovana smanjenom metilacijom promotora gena zabilježena je u karcinomu želuca (123). U karcinomu dojke pokazan je

gubitak lizin metiltransferaze SETD7 (eng. *SET domain containing 7, histone lysine methyltransferase*), koja dodaje represivne oznake na histone prisutne u promotoru gena *GLI1*. Gubitak represivnih oznaka rezultira pojačanom ekspresijom *GLI1* i malignim potencijalom stanica (124). Čretnik i suradnici dokazali su hipermetilaciju promotora gena *PTCH1* u dermoidima i fibromima jajnika koja rezultira njegovom smanjenom ekspresijom (125). Nekodirajuće RNA, miRNA i lncRNA također mogu regulirati aktivnost signalnog puta HH-GLI. Mir-141-3p djeluje protutumorski tako što vezanjem GLI2 blokira proliferaciju te potiče apoptozu stanica osteosarkoma (126). Zhang i suradnici pokazali su da se GLI2 pojačano eksprimira u karcinomu želuca zahvaljujući lncRNA MALAT1 koja vezanjem mir-202 onemogućava njegovu inhibiciju (127).

## 1.4 Nekanonska aktivacija signalnog puta Hedgehog-GLI

Nekanonska aktivacija signalnog puta HH-GLI rezultat je funkcionalne interakcije s drugim signalnim putevima koji direktno ili indirektno djeluju na transkripcijske faktore GLI neovisno o ligandu HH i membranskim komponentama PTCH1 i SMO. Poznata je interakcija signalnog puta HH-GLI s putevima prijenosa PI3K/AKT, mTOR, TGF- $\beta$ , AMPK, PKC te RAS/RAF/MAPK (Slika 1.11) (128).



**Slika 1.11.** Nekanonska aktivacija HH-GLI drugim signalnim putevima koji su povezani s karcinogenezom poput PI3K/AKT, RAS/RAF/MAPK i mTOR. Zelenom bojom označeni su pozitivni, a crvenom bojom negativni regulatori HH-GLI (128).

PI3K/AKT sprječava proteasomalnu degradaciju GLI2 tako što ometa inhibitornu funkciju kinaze PKA, čime u konačnici potiče njegovu translokaciju u jezgru i transkripcijsku aktivnost (129). Aktivnost PI3K/AKT u svrhu očuvanja stabilnosti GLI1 i poticanja njegove transkripcijske aktivnosti zabilježena je u karcinomu gušterače, jajnika, prostate, gliomima i melanomu (128). Važnost ove interakcije potvrđuje činjenica da se povećana aktivnost PI3K/AKT povezuje s pojavom otpornosti tumorskih stanica na terapiju inhibitorima koreceptora SMO (130). Dennler i suradnici prvi su pokazali da TGF- $\beta$  regulira transkripcijske faktore GLI neovisno o SMO u normalnim fibroblastima, keratinocitima te tumorskim stanicama. Kasnije je pokazano da je TGF- $\beta$  potreban za ekspresiju GLI i proliferaciju stanica karcinoma gušterače rezistentnih na ciklopamin (131). Daljnje studije pokazale su da je GLI2 direktna transkripcijska meta TGF- $\beta$  preko proteina SMAD3 i  $\beta$ -katenin koji se vežu na promotor *GLI2* (132). Također, TGF- $\beta$  potiče aktivaciju GLI1 u tumorskim stanicama kako bi se potakla transkripcija komponenata TGF- $\beta$  poput BCL2, IL-7 te ciklina D1 (133). Veza HH-GLI i PKC kontroverzna je zbog mnogih kontradiktornih istraživanja. Konstitutivna aktivacija PKC $\alpha$  povezuje se sa smanjenom transkripcijskom aktivnošću GLI1, dok se smatra da PKC $\delta$

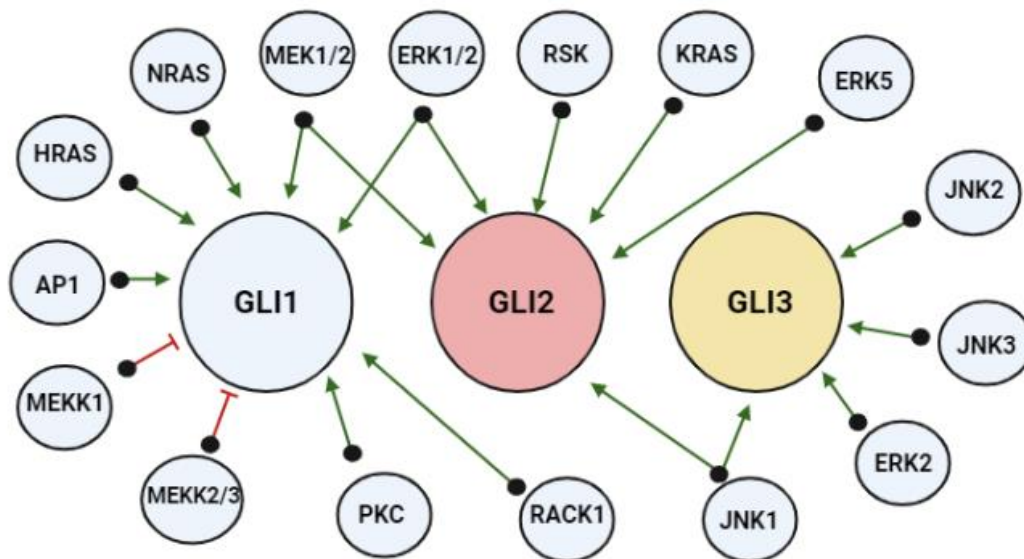
potiče aktivnost GLI1 neovisno o putu prijenosa RAS/RAF/MAPK (134). Suprotno tome, druga studija pokazala je da PKC $\alpha$  potiče aktivaciju GLI1 preko RAS/RAF/MAPK u tumoru jetre, a PKC $\delta$  funkcionira kao negativni regulator HH-GLI (135). PKC $\zeta/\lambda$  fosforilira GLI1 u domeni cinkova prsta te potiče njegovo vezanje za promotore ciljnih gena i transkripcijsku aktivnost. GLI1, između ostalog, potiče transkripciju gena PKC $\zeta$  čime se ostvaruje pozitivna povratna regulacija. Važnost interakcije vidljiva je iz toga što je PKC $\zeta/\lambda$  prekomjerno aktivna u bazocelularnim karcinomima rezistentnim na vismodegib, te da supresija PKC $\zeta/\lambda$  rezultira smanjenom aktivnosti HH-GLI (53). Interakcija HH-GLI i mTOR otkrivena je kada je opaženo da tumori s amplifikacijama gena *GLI1* poput rabdomyosarkoma iznimno reagiraju na terapiju inhibitorom mTOR, rapamicinom (136). mTOR pozitivno regulira HH-GLI te se smatra da toj aktivaciji posreduju drugi signalni putevi poput TGF- $\beta$ . Aktivacija signalnog puta AMPK uzrokuje inhibitornu fosforilaciju GLI1 koja blokira transkripcijsku aktivnost i narušava stabilnost (137). Također, AMPK potiče lokalizaciju GLI1 u citoplazmu te interakciju s ubikvitin ligazom  $\beta$ -TrCP koja potiče njegovu proteasomalnu degradaciju (138). Postoje studije koje pokazuju da AMPK može biti pozitivan regulator HH-GLI u metaboličkom reprogramiranju adipocita prema glikolizi (139). S obzirom na to da je interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI posebno važna, biti će detaljno opisana u zasebnom potpoglavlju ovog doktorskog rada.

#### **1.4.1 Interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI**

Prvi dokazi interakcije HH-GLI i RAS/RAF/MAPK proizašli su iz istraživanja koje je pokazalo da konstitutivna aktivacija MEK1 uzrokuje pojačanu aktivnost GLI1, te da se aktivnost prekida inhibicijom MEK1/2. Autori istraživanja kasnije su otkrili na proteinu GLI1 domenu građenu od 130 aminokiselina koju prepoznaju ERK1/2. Delecijom te domene dobiva se aktivni protein GLI1 sa smanjenim odgovorom na MEK1 (140). Veliki broj istraživanja pokazao je da RAS/RAF/MAPK može modulirati aktivnost HH-GLI u raznim tipovima tumora. U melanomu, mutirani proteini NRAS i HRAS mogu poticati transkripcijsku aktivnost GLI1 te njegovu translokaciju u jezgru. Također, oba proteina destabiliziraju kompleks GLI-SUFU te tako onemogućavaju zadržavanje proteina GLI u citoplazmi koje u konačnici dovodi do njihove proteosomalne razgradnje (105). KRAS može aktivirati HH-GLI u karcinomu gušterače tako što potiče aktivaciju GLI1 neovisno o tretmanu ciklopaminom, iz čega se može zaključiti da je interakcija neovisna o koreceptoru SMO. Tretman inhibitorom MEK1/2, UO126, smanjuje aktivnost i stabilnost proteina GLI1 (141). Na mišjem modelu karcinoma gušterače pokazano je da mutirani KRAS stupa u interakciju s formom proteina GLI2 kojoj nedostaje terminalna represorska domena te potiče tumorigenezu (142). Sato i suradnici pokazali su da se aktivacija HH-GLI inducira dodatkom EGF (eng. *Epidermal growth factor*) te da je aktivacija potpuno neovisna o inhibiciji koreceptora SMO (143). U adenokarcinomu pluća, GLI1 aktivan



je iako je aktivnost SMO vrlo često utišana epigenetičkim mehanizmima. U takvim slučajevima inhibicija HH-GLI inhibitorima SMO u potpunosti je neučinkovita, dok inhibicija GLI1 dovodi do redukcije rasta tumorskih stanica. U multiplom mijelomu, MEK1/RSK (eng. *Ribosomal S6 kinase*) potiču nekanonsku aktivaciju HH-GLI tako što stabiliziraju GLI2. RSK potiče translokaciju GLI2 u jezgru i onemogućava inhibitornu fosforilaciju putem GSK3 $\beta$ . Kombinirani tretman inhibitorom RSK SL0101 i inhibitorom GLI, GANT58 smanjuje proliferaciju tumorskih stanica i aktivnost HH-GLI (144). Bardwell i suradnici pokazali su da ERK2 fosforilira GLI1 u veznoj domeni za SUFU te tako onemogućava njegovo vezanje te potiče transkripcijsku aktivnost GLI1 (145). Brojni faktori rasta koji se vežu za receptorske tirozin kinaze mogu, aktivirajući RAS/RAF/MAPK, modulirati aktivnost HH-GLI neovisno o SMO. U normalnim keratinocitima, koekspresija EGF i GLI potiče istovremenu aktivaciju HH-GLI i ERK1/2 te onkogenu transformaciju stanica (146). EGFR (eng. *Epidermal growth factor receptor*) modulira HH-GLI tako što regulira interakciju GLI1 i GLI2 s transkripcijskim kofaktorima u promotorima svojih ciljnih gena. Stimulacijom EGFR, aktiviraju se ERK1/2 koji djeluju na svoje nizvodne mete JUN/AP-1. JUN/AP-1 djeluju kao kofaktori proteina GLI te potiču transkripciju ciljnih gena uključenih u malignu transformaciju stanica. Istovremeno, ERK1/2 čuvaju stabilnost GLI1 i GLI2 tako što sprječavaju njihovu proteasomalnu degradaciju (147). Zbirni prikaz opisanih interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI prikazan je na slici 1.12.



**Slika 1.12** Interakcije signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI. Zelene strelice ukazuju na pozitivnu regulaciju, a crvene na negativnu (shema izrađena pomoću platforme BioRender <https://app.biorender.com>).

Suprotno prethodnim studijama, postoje istraživanja koja pokazuju da RAS/RAF/MAPK može negativno regulirati HH-GLI. Uzvodne kinaze MEKK1 i MEKK2/3 utišavaju aktivnost GLI1 te smanjuju vijabilnost stanica meduloblastoma. MEKK1 direktno fosforilira GLI1 na C-terminalnim domenama potičući njegovu interakciju s citoplazmatskim proteinom 14-3-3 i redukciju transkripcijske aktivnosti (148). U meduloblastomu je pokazano da fosforilacija GLI1 putem MEKK2/3 narušava stabilnost GLI1 te potiče njegovo vezanje za SUFU (149). Dok je regulacija HH-GLI putem RAS/RAF/MAPK dokumentirana brojnim publikacijama, malo se zna o tome kako HH-GLI regulira RAS/RAF/MAPK. Nedavna studija Tusa i suradnika pokazala je da se povećana aktivacija HH-GLI uzrokovana inhibicijskom mutacijom *PTCH1* povezuje s višom razinom ERK5 na genskoj i proteinskoj razini. Istraživanje je pokazalo da se GLI1 direktno veže za promotor gena *MAPK7* te da je indukcija ERK5 putem HH-GLI iznimno važna za proliferaciju stanica melanoma. Kombiniranom inhibicijom ERK5 i HH-GLI dokida se vijabilnost i invazija stanica (150). S obzirom na to da je interakcija HH-GLI i RAS/RAF/MAPK važna u mnogim aspektima karcinogeneze, modifikacija ovih interakcija uporabom kombinacije inhibitora ima izniman potencijal. Potrebna su daljnja istraživanja kojima će se bolje ispitati priroda međusobne regulacije te njene posljedice na funkcioniranje stanice.

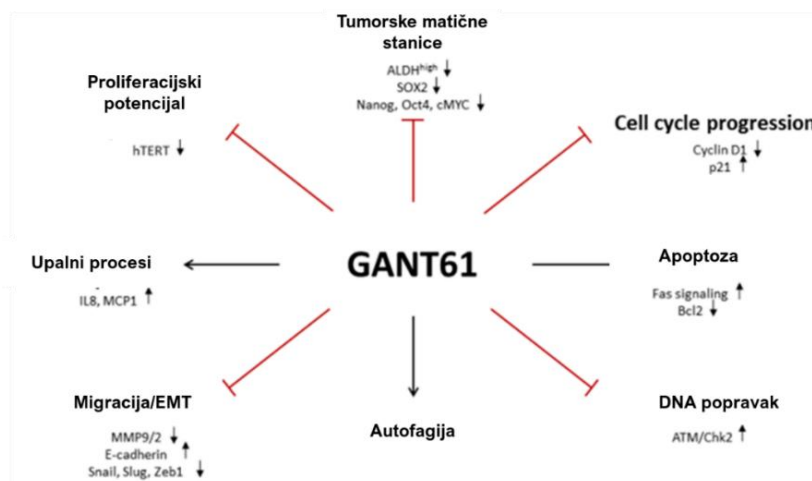
## 1.5 Signalni put Hedgehog-GLI kao terapijska meta

Signalni put Hedgehog-GLI kao put prijenosa koji regulira niz esencijalnih staničnih procesa, predstavlja atraktivnu metu za razvoj novih terapijskih pristupa. Prvi otkriveni inhibitor HH-GLI je ciklopamin, prirodno prisutan alkaloid iz biljke *Veratrum californicum*, koji direktnim vezanjem za koreceptor SMO blokira njegovu aktivnost (151). Ciklopamin nikada nije došao u kliničku primjenu zbog visoke toksičnosti, teratogenih svojstva te slabih farmakokinetičkih karakteristika (152). Od otkrića prvog inhibitora do danas razvijen je velik broj kemijskih spojeva koji modificiraju aktivnost HH-GLI na različitim razinama: uzvodno od koreceptora SMO, na razini koreceptora SMO te nizvodno od koreceptora SMO. Prve inhibitore uzvodno od koreceptora SMO, **inhibitore HH aciltransferaza**, razvila je grupa znanstvenika instituta Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Enzimi HH aciltransferaze dodaju palmitinsku kiselinu na N-kraj nezrelog proteina HH te su iznimno važne u procesu sazrijevanja liganda HH (153). Nakon inhibitora HH aciltransferaza, razvijena je i grupa **makrocikličkih peptida** koji inhibiraju ligande HH te njihovu interakciju s receptorom PTCH1. Struktura razvijenih inhibitora napravljena je po uzoru na veznu domenu za SHH proteina HHIP (eng. *Hedgehog interacting protein*) koji djeluje kao negativni regulator HH-GLI tako što veže ligande HH (154). Grupa znanstvenika Sveučilišta Kalifornija razvila je **anti-SHH monoklonalna protutijela** kao inhibitore HH-GLI te neki od njih pokazuju veliki potencijal u pretkliničkim ispitivanjima (155).

Tijekom zadnjeg desetljeća, razvoj inhibitora HH-GLI dominantno se temelji na razvoju antagonista koreceptora SMO. Upravo je inhibitor koreceptora SMO, **vismodegib**, prvi inhibitor HH-GLI koji je odobrila FDA (eng. *Food and Drug Administration*) (156). Vismodegib se koristi za liječenje uznapredovalog i metastatskog bazocelularnog karcinoma. Iako njegova primjena ima inicijalni učinak, terapija vrlo često dovodi do nastanka rijetkih mutacija u genu *SMO* koje su povezane s razvojem otpornosti na lijekove. Trenutno se učinak vismodegiba u obliku monoterapije i kombinacije s drugim kemoterapeutima proučava u kliničkim ispitivanjima na raznim tipovima tumora uključujući karcinom prostate, glioblastom, meduloblastom te karcinom gušterače (157). Drugi inhibitor SMO koji je odobrila FDA, **sonidegib**, pokazao je efekt redukcije rasta tumorskih stanica na modelu meduloblastoma, karcinoma prostate i melanoma (157). Kao i kod vismodegiba, dugotrajna terapija sonidegibom dovodi do razvoja mutacija *SMO* koje mijenjaju učinkovitost same terapije (130). **Saridegib**, sintetički derivat ciklopamina s poboljšanom stabilnošću, smanjio je aktivnost HH-GLI na modelu meduloblastoma i karcinoma gušterače (158). **Itrakonazol**, antimikotički lijek koji je odobrila FDA, otkriven je kao inhibitor HH-GLI analizom baze postojećih lijekova. Tretman itrakonazolom blokira translokaciju SMO u primarnoj ciliji. Također, pokazana je inhibicija rasta tumorskih stanica na modelu meduloblastoma i bazocelularnih karcinoma s mutacijama *SMO* otpornih na terapiju (159,160). **Glasdegib**, inhibitor koji se veže za koreceptor SMO i onemogućava transdukciju signala trenutno je u kliničkim ispitivanjima za liječenje hematoloških oboljenja (158). Nedavno je otkrivena grupa **derivata acilgvanidina** koji pokazuju odličnu efikasnost u blokiranju aktivnosti SMO u kliničkim istraživanjima (157).

Kod većine tumora, kanonski put prijenosa HH-GLI nije primaran, već se proteini GLI aktiviraju nekanonski neovisno o koreceptoru SMO. Zato vrlo često dolazi do pojave razvoja otpornosti na inhibitore SMO te se znanstvenici fokusiraju na razvoj inhibitora koji djeluju nizvodno od koreceptora SMO, inhibitore transkripcijskih faktora GLI. Razlikujemo direktne inhibitore proteina GLI te indirektne, koji ciljajući druge proteine koji su u interakciji s proteinima GLI modificiraju njihovu aktivnost. Najpoznatiji direktni inhibitori proteina GLI su **GANT58** i **GANT61** (eng. *GLI antagonist*) čija je inhibitorna aktivnost otkrivena analizama na staničnoj liniji HEK293 (161). Osim inhibicije uzrokovane direktnim stupanjem u interakciju s proteinima GLI, ovi spojevi modificiraju GLI1 i tako što mijenjaju sposobnost vezanja za molekulu DNA. GANT61 indirektno uzrokuje oštećenja DNA te inhibira vezanje GLI2 za promotore ciljnih gena *HHIP* i *BCL-2*. Efekti GANT61 narušavaju mnoge osnovne stanične procese koji doprinose karcinogenezi poput vijabilnosti stanica, proliferacije, apoptoze, autofagije, EMT i održavanja populacije matičnih stanica (Slika 1.13) (162). GANT58 i GANT61 smanjuju proliferaciju širokog spektra tumorskih stanica, od karcinoma prostate, pluća, crijeva do glioblastoma (163). Iako je otkriven kasnije, GANT61 je u odnosu na GANT58 efikasniji inhibitor

tumorigeneze. GANT61 se diljem znanstvene zajednice koristi kao pozitivna kontrola za razvoj novih inhibitora visoke specifičnosti za proteine GLI. Unatoč tome, GANT61 je nestabilan u fiziološkim uvjetima te se brzo hidrolizira u biološki inaktivnu aldehidnu formu (GANT61-A) te diaminski derivat (GANT61-D) koji blokira transkripcijsku aktivnost proteina GLI (164). Zato se nastoje razviti novi, jednako specifični inhibitori proteina GLI. GANT61 se vrlo često u istraživanju koristi u kombinaciji s drugim inhibitorima. GANT61 u kombinaciji s inhibitorom BCL2, obatoklaksom, pokazuje sinergistički učinak u blokiranju rasta stanica melanoma (165). U usporedbi s inhibicijom kanonskog prijenosa signala (inhibicijom SMO), nizvodna inhibicija predstavlja učinkovitiji pristup u terapiji tumora. Benvenuto i suradnici usporedili su učinkovitost ova dva pristupa te pokazali na mišjem modelu karcinoma dojke da je GANT61 mnogo efikasniji u odnosu na inhibiciju SMO (166). Lospinoso Severini i suradnici su modifikacijom prethodno otkrivenog izoflavona koji pokazuje HH-GLI inhibitornu aktivnost, razvili spoj koji istovremeno inhibira aktivnost GLI1 i koreceptora SMO čime je postignut sinergistički učinak inhibicije HH-GLI (167). Razvoj ovakvih spojeva osobito je važan zbog učestale pojave otpornosti na inhibitore koreceptora SMO.



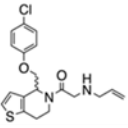
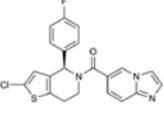
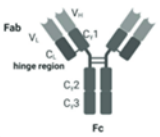
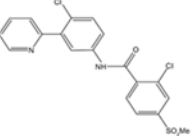
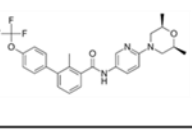
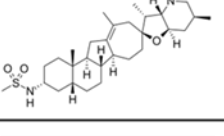
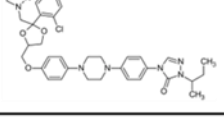
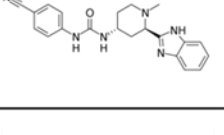
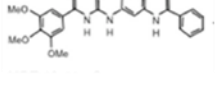
**Slika 1.13** Efekti GANT61 na neke od temeljnih procesa koji su narušeni u karcinogenezi.

**Arsenov trioksid** (ATO) kemijski je spoj koji je odobrila FDA kao terapija druge linije za liječenje akutne promijelocitne leukemije (168). ATO direktno stupa u interakciju s domenom cinkova prsta proteina GLI čime je onemogućeno njihovo vezanje za DNA. Također, pokazano je da ATO onemogućava akumulaciju komponenata HH-GLI u primarnoj ciliji (169). Za razliku od GANT61, ATO ima višestruke protutumorske efekte tako što djeluje na više signalnih puteva kao što su RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT i NF- $\kappa$ B. You i suradnici pokazali su da ATO indirektno inhibira proteine GLI tako što potiče degradaciju AKT, pozitivnog regulatora HH-GLI (170). Zbog visoke toksičnosti, klinička primjena arsenovog trioksida ograničena je za nehematološka maligna oboljenja. Zato se radi na razvoju arsenovih spojeva koji bi mogli biti primjereniji za širi spektar malignih oboljenja.

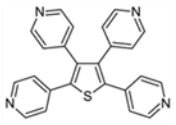
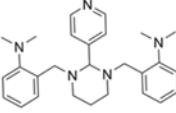
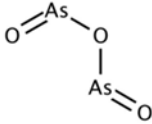
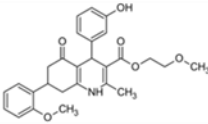
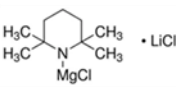
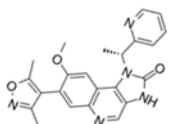
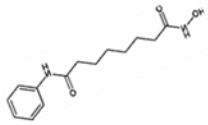
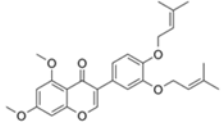
Tijekom zadnjeg desetljeća razvijena je grupa malih molekula, **HPI** (eng. *Hedgehog Pathway Inhibitors*) koje blokiraju proteine GLI potpune duljine neovisno o nekanonskim partnerima HH-GLI (171). Iako ova grupa spojeva pokazuje iznimne učinke inhibicije *in vitro*, u uvjetima *in vivo* imaju nisku bioraspoloživost zbog slabe topivosti u vodi. Chenna i suradnici nedavno su razvili sustav u kojem je inhibitor HPI enkapsuliran u nanočestice polimera te bi se tako mogla povećati bioraspoloživost ovih spojeva (172). Indirektni inhibitori proteina GLI blokiraju njihovu funkciju preko mehanizama kojima se regulira njihova aktivnost, poput proteolitičke degradacije i posttranslacijskih modifikacija. Većinu indirektnih inhibitora odobrila je FDA ili su u uznapredovalim kliničkim ispitivanjima jer su mehanizmi njihova djelovanja vrlo dobro opisani. **Litijev klorid** (LiCl) agens je koji se desetljećima koristi za liječenje psihijatrijskih poremećaja poput bipolarnog poremećaja i depresije te je ubrzo opaženo da pacijenti liječeni litijevim kloridom imaju manju incidenciju razvoja malignih bolesti (173). Litijev klorid potiče inhibitornu fosforilaciju kinaze GSK3 $\beta$  koja na posttranslacijskoj razini regulira aktivnost proteina GLI. Tako je onemogućeno djelovanje GSK3 $\beta$  na protein SUFU i oslobađanje proteina GLI iz kompleksa SUFU-GLI u citoplazmi (174). **Inhibitori obitelji proteina BET** već su godinama prepoznati kao važna terapijska strategija u raku. Radi se o proteinima koji vežu mjesta početka transkripcije na molekuli DNA. Pokazano je da inhibitori proteina BET snižavaju razinu mRNA *GLI1*, *GLI2* i *SHH* (175). Histon deacetilaze (HDAC) grupa su enzima koji modulirajući stupanj acetilacije histona kontroliraju transkripciju gena. Određene HDAC od esencijalne su važnosti za HH-GLI tako što potiču transkripcijsku aktivnost *GLI1*, *GLI2* te stabilnost *GLI3* (176). Mirza i suradnici pokazali su da postoji pozitivna povratna regulacija između HDAC1 i HH-GLI, tako što HDAC1 potiče transkripcijsku aktivnost GLI, a ciljani geni HH-GLI povratno potiču aktivnost HDAC1 (177).

Posljednjih godina opisan je veliki broj potencijalnih inhibitora HH-GLI prirodnog porijekla. **Glabrescione B** (GlaB), izoflavon iz biljke *Derris glabrescens* specifično se veže za strukture cinkova prsta *GLI1* i *GLI2* te na taj onemogućava njihovu transkripcijsku aktivnost (178). Zaista postoji široki spektar inhibitora koji ciljaju komponente signalnog puta HH-GLI (sažeto u tablici 1.1). Direktni inhibitori proteina GLI su zbog svojih pojedinih neželjenih karakteristika još uvijek u pretkliničkoj ili kliničkoj fazi ispitivanja.

**Tablica 1.1** Zbirni prikaz opisanih inhibitora signalnog puta HH-GLI.

SPOJ	STRUKTURA	CILJNI PROTEIN	MEHANIZAM	FDA ODOBRENJE
INHIBITORI HH ACILTRANSFERAZA (pr. RUSKI-41)		HH	INHIBICIJA SAZRIJEVANJA LIGANDA HH	NE
MAKROCIKLIČKI PEPTIDI (pr. 1-(R))		HH	INHIBICIJA INTERAKCIJE S RECEPTOROM PTCH1	NE
ANTI-SHH MONOKLONALNA PROTUTIJELA (pr. 1C11-2G4)		SHH	VEZANJE SHH I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE
VISMODEGIB		SMO	VEZANJE SMO I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	DA
SONIDEGIB		SMO	VEZANJE SMO I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	DA
SARIDEGIB		SMO	VEZANJE SMO I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE
ITRAKONAZOL		SMO	INHIBICIJA LOKALIZACIJE SMO U PRIMARNU CILJU	DA
GLASDEGIB		SMO	VEZANJE SMO I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE
DERIVATI ACILGVANIDINA (pr. MRT-10)		SMO	VEZANJE SMO I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE

**Tablica 1.1 (nastavak)** Zbirni prikaz opisanih inhibitora signalnog puta HH-GLI.

SPOJ	STRUKTURA	CILJNI PROTEIN	MEHANIZAM	FDA ODOBRENJE
GANT58		GLI1/2/3	VEZANJE GLI I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE
GANT61		GLI1/2/3	VEZANJE GLI I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE
ARSENOV TRIOKSID		GLI1/2/3	VEZANJE GLI I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	DA
HEDGEHOG PATHWAY INHIBITORS (HPI) (pr. HPI-1)		GLI1/2/3	VEZANJE SMO I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE
LITIJ KLORID		GSK3β	POTICANJE INHIBITORNE FOSFORILACIJE GSK3β	DA
INHIBITORI PROTEINA BET (pr. IBET-151)		GLI1/2	INHIBICIJA FIZIČKE INTERAKCIJE S PROTEINIMA GLI	DA
INHIBITORI HISTON DEACETILAZA (pr. Vorinostat)		GLI1/2/3	INHIBICIJA AKTIVATORSKE ACETILACIJE PROTEINA GLI	DA
GLABRESCIONE B		GLI1/2	VEZANJE GLI I BLOKIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI	NE

## 1.6 Otpornost tumorskih stanica na kemijske spojeve

Trenutne opcije liječenja tumora uključuju kirurško odstranjivanje, kemoterapiju, radioterapiju, ciljanu terapiju, endokrinu terapiju te imunoterapiju. Među navedenim mogućnostima, kemoterapija je najučestalija te omogućava sistemsko ciljanje brzo proliferirajućih tumorskih stanica. U nekim slučajevima kemoterapija dovodi do redukcije tumorske mase, no u velikom broju slučajeva razvija se otpornost stanica na primijenjenu terapiju što dovodi do relapsa bolesti i pojave metastaza (17). Vrlo često je uzrok tome populacija tumorskih matičnih stanica, koje kao mirujuće sporoproliferirajuće stanice zaobilaze djelovanje velikog broja kemoterapeutika (108). Procesu razvoja otpornosti na terapiju, jako je slično svojstvo tolerancije stanica na terapiju. Dok su stanice otporne na terapiju u potpunosti ireverzibilno reprogramirane tako da sadrže genomske alteracije i transkriptom koji im omogućava preživljenje u prisutnosti terapeutika, stanice tolerantne na terapiju ulaze u mirujuće stanje smanjene diobe, fenotip sličan onome kod tumorskih matičnih stanica. Stjecanjem takvog fenotipa, mogu do određene mjere tolerirati tretman terapeutikom, no s obzirom na to da se radi o reverzibilnom fenomenu, stanice tolerantne na terapiju se privremenim uklanjanjem terapeutika mogu ponovo učiniti osjetljivima. Stanice koje ostanu dovoljno dugo u stanju tolerancije, mogu preći trajno u stanje otpornosti (179). Kao što je već spomenuto, u melanomu otpornost stanica na terapiju predstavlja veliki zdravstveni problem. U stanicama otpornim na terapiju, signalni putevi poput HH-GLI i RAS/RAF/MAPK dobivaju karakteristike kojima zaobilaze djelovanje kemijskog spoja te stvaranjem alternativnih mehanizama održavaju stanične procese esencijalne za promociju karcinogeneze.

### 1.6.1 Signalni put Hedgehog-GLI u otpornosti stanica na kemijske spojeve

S obzirom na to da su proteini GLI krajnji efektori kanonske i nekanonske aktivacije HH-GLI, predstavljaju potencijalne mete za terapiju tumora. Ekspresija svih komponenata HH-GLI, neovisno radi li se o uzvodnim poput SHH, PTCH1, SMO i SUFU ili nizvodnim kao što su proteini GLI, povezuje se s različitim aspektima razvoja otpornosti. Bidet i suradnici prvi su u svom istraživanju pokazali da PTCH1 djeluje kao višestruki transporter kemijskih spojeva, te može biti uključen u uspostavu otpornosti tumorskih stanica na kemoterapiju. Na modelu kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) opazili su da PTCH1 potiče izbacivanje kemijskih spojeva poput doksorubicina, metotreksata, temozolomida te 5-fluorouracila. Svoju hipotezu potvrdili su istraživanjem u kojem su pokazali da mišji fibroblasti NIH3T3 tretirani ligandom SHH imaju smanjeni transport doksorubicina. Daljnim studijama pokazali su da PTCH1 koristeći protonski gradijent uslijed uvjeta kod glikolize neovisne o kisiku omogućava opažene učinke (180). Kasnije je pokazano i na modelu melanoma i leukemije da smanjenu razinu PTCH1 prati i smanjeno izbacivanje doksorubicina iz tumorskih stanica, te da se učinak gubi dodatkom



liganda SHH (181). Inhibicija transporterske aktivnosti PTCH1 u stanicama melanoma s mutacijom *BRAF V600E* dovodi do ponovne osjetljivosti na inhibitor vemurafenib (182).

Otpornost na inhibitore koreceptora SMO može se podijeliti na primarnu i sekundarnu otpornost. Primarnu otpornost karakterizira pojava da pacijent ishodišno ne reagira na inhibitore SMO, što se događa u slučaju kada su komponente nizvodno od SMO poput *SUFU* mutirane (183). Sekundarna otpornost javlja se nakon što pacijent inicijalno reagira na terapiju. Smatra se da su glavni razlozi uspostave sekundarne otpornosti na inhibitore SMO pojava mutacija u genu *SMO*, nekanonska aktivacija HH-GLI te gubitak primarne cilije (184). Mutacije *SMO* zapažene su u čak 50% bazocelularnih karcinoma koji ne odgovaraju na terapiju inhibitorima SMO. Mutacije *SMO* mogu se podijeliti u dvije kategorije: mutacije koje se događaju u domeni proteina koja veže lijek te mutacije koje se događaju van mjesta vezanja. Spontane mutacije C469Y, D473G/H/N/Y, I408V, V321M te W281C/L onemogućavaju vezanje inhibitora SMO poput vismodegiba za koreceptor SMO. Mutacije T241M, A459V, S553N i G497W koje se događaju izvan mjesta za vezanje inhibitora, destabiliziranjem konformacije *SMO* promoviraju njegovu aktivnost i smanjuju afinitet za vezanje inhibitora (43).

Osim mutacija *SMO*, do pojave otpornosti na inhibitore SMO mogu dovesti mutacije i amplifikacije drugih gena. Amplifikacije *GLI2* te njegove transkripcijske mete *CCND1* smatraju se jednim od mehanizama odgovornih za otpornost na vismodegib (185). Meduloblastomi s mutacijama u genima *SUFU* i *MYCN* pokazuju primarnu otpornost na sonidegib (186). Nekanonske interakcije HH-GLI i ostalih signalnih puteva mogu zaobići djelovanje inhibitora *SMO*. Yao i suradnici pokazali su da TGF- $\beta$  aktivacijom transkripcijskog kofaktora MRTF važnog za transkripcijsku aktivnost GLI, potiče nekanonsku aktivaciju HH-GLI i otpornost na inhibitore *SMO* u bazocelularnom karcinomu (187). Mutacije u onkogenima *HRAS* (G12V) i *BRAF* (V600E) dovode do pojave otpornosti na inhibitore *SMO*, sonidegib i vismodegib (188). Seidl i suradnici pokazali su da stanice karcinoma pluća rezistente na cisplatinu imaju smanjenu ekspresiju mir-182-5p koja negativno regulira *GLI2* (189).

Jedan od nedavno otkrivenih mehanizama povezanih s otpornosti na inhibitore *SMO* je gubitak primarne cilije. Gubitak primarne cilije zapažen je u meduloblastomima otpornim na terapiju sonidegibom. Genomskom analizom ustanovljeno je da takvi meduloblastomi često nose mutacije u genima *SUFU* i *OFD1* koje mogu doprinijeti gubitku primarne cilije (190).

Transkripcijski faktori GLI, modulirajući višestruke stanične procese, mogu poticati pojavu otpornosti na inhibitore na više načina. Proteini GLI regulirajući ekspresiju enzima potrebnih za popravak oštećenja DNA mogu doprinijeti razvoju otpornosti. Wang i suradnici pokazali su da je enzim MGMT (metilgvanin-DNA metiltransferaza) direktna transkripcijska meta *GLI1* u gliomima čime se povećava potencijal tumorskih stanica za popravak oštećenja DNA i potiče

otpornost na terapiju (191). Nedavna studija pokazala je da u uvjetima hipoksije, petlja HIF-1/SHH/GLI1 potiče aktivnost MGMT te dovodi do otpornosti na temozolomid (192). Zhang i suradnici pokazali su da je NBS1, protein važan za popravak dvolančanih lomova DNA, direktna transkripcijska meta GLI1 u karcinomima debelog crijeva rezistentnih na 5-fluorouracil (193). Modulacija procesa autofagije proteinom GLI također doprinosi nastanku otpornosti tumorskih stanica. Istraživanje Amantini i suradnika pokazalo je da HH-GLI pozitivno regulira autofagiju nakon tretmana kemoterapeutičima doksorubicinom i gemcitabinom zbog čega dolazi do njihova smanjenog djelovanja u stanicama karcinoma mokraćnog mjehura (194). Suprotno tome, druga studija pokazala je da HH-GLI negativno regulira autofagiju, čime onemogućava smrt stanica i dovodi do otpornosti stanica glioblastoma na tretman temozolomidom (195).

Jedan od procesa koji doprinosi otpornosti stanica, a reguliran je signalnim putem HH-GLI, je interakcija tumorskih stanica s mikrookolišem. Hui i suradnici pokazali su u ranijem istraživanju da u karcinomu dojke tumorske stanice aktiviraju HH-GLI u stanicama strome kako bi promovirali otpornost na terapiju. Indukcijom HH-GLI u fibroblastima potiče se proizvodnja proteina ekstracelularnog matriksa (COL2A1, COL3A1, COL4A1) te metaloproteinaza matriksa (MMP3, MMP13, MMP15) koji remodeliraju ekstracelularni prostor što doprinosi stvaranju otpornijeg staničnog fenotipa (196). GLI1 preko šaperona kalretikulina regulira stabilnost UGT1A (UDP-glukuronoziltransferaza 1A), enzima koji kemijski modificira čitav spektar kemoterapeutika poput memotreksata, idarubicina i sunitiba te tako potiče njihovu degradaciju i izbacivanje iz stanice (197). Po i suradnici pokazali su da GLI1 transkripcijski regulira članove obitelji ABC-transportera (eng. *ATP-binding cassette*) ABCA2, ABCB1, ABCB4, ABCB, ABCC2 i ABCG1 čime doprinosi razvoju otpornosti stanica na 5-fluorouracil i oksaliplatinu u karcinomu debelog crijeva (198). Regulirajući proces EMT kroz aktivaciju transkripcijskih faktora TWIST1/2, SNAI1, SLUG i ZEB1/2, HH-GLI indirektno promovira otpornost stanica, tako što pojačana aktivnost navedenih transkripcijskih faktora uzrokuje i jaču ekspresiju ABC-transportera (199).

Zbog svojih karakteristika, tumorske matične stanice vrlo su često odgovorne za pojavu otpornosti na kemoterapiju i relaps bolesti. Smatra se da je HH-GLI od esencijalne važnosti za održavanje CD44-pozitivne populacije tumorskih matičnih stanica karcinoma želuca i jednjaka koje pokazuju svojstvo kemorezistencije (17). Usui i suradnici pokazali su da je HH-GLI jedan od glavnih regulatora razvoja otpornosti na 5-fluorouracil u trodimenzionalnim kulturama organoida karcinoma debelog crijeva (200). U kontekstu signalnog puta HH-GLI, pojava otpornosti na inhibitore SMO učestali je problem. Proteini GLI kao krajnji efektori predstavljaju idealnije ciljne mete za razvoj potencijalnih novih terapija. Za razvoj novih inhibitora GLI, potrebno je između ostalog na neki način predvidjeti i onemogućiti mehanizme

koji bi potencijalno doveli do pojave otpornosti. U tu svrhu, mogu se koristiti stanični modeli otpornosti na inhibitore GLI, na kojima će se istražiti mehanizmi odgovorni za taj fenomen. Trenutno, u znanstvenoj zajednici nema uspostavljenih i opisanih staničnih modela otpornosti na inhibitore GLI.

### **1.6.2 Signalni put RAS/RAF/MAPK u otpornosti stanica na kemijske spojeve**

Signalni put RAS/RAF/MAPK predstavlja put prijenosa koji je najčešće promijenjen u melanomu. Čak kod 80% tumora rezistentnih na inhibitore BRAF, uzrok otpornosti predstavlja reaktivacija signalnog puta RAS/RAF/MAPK. Jedan od mehanizama koji dovodi do pojave otpornosti kod 20% melanoma amplifikacija je mutiranog gena *BRAF* zbog čega su inhibitori vrlo često nedovoljno efikasni. Pojačana ekspresija BRAF može dovesti do spontane dimerizacije proteina čime se potiče reaktivacija signalnog puta. Alternativnim prekrajanjem *BRAF*, nastaju različite varijante gena koje su povezane s 15-30% melanoma otpornih na terapiju. Kod pacijenata sa sekundarnom otpornošću na inhibitor vemurafenib često je opažena varijanta BRAFV600E. Ta varijanta dovodi do formiranja dimera BRAF neovisno o aktivaciji kinaze RAS, čime se dokida učinak inhibitora BRAF koji djeluju samo na monomere proteina (201).

Jedan od razloga otpornosti na inhibitore BRAF heterogenost je tumora u kontekstu proteina BRAF. Unutar tumora, neke će stanice imati protein BRAF divljeg tipa, a dio mutirani protein. Inhibitor će djelovati na monomere mutiranog proteina BRAF, no istovremeno može potaknuti neželjeno stvaranje dimera između divljeg tipa proteina BRAF i CRAF čime se potiče reaktivacija RAS/RAF/MAPK (202). Mutacije komponenata nizvodno od BRAF kao što su MEK1/2 također mogu dovesti do reaktivacije MAPK koja je neovisna o djelovanju inhibitora BRAF. Mutacija MAP3K8 dovodi do aktivacije MAPK tako što uzrokuje fosforilaciju kinaza MEK. Pokazano je da su stanice sa smanjenom aktivnošću MAP3K8 osjetljivije na inhibiciju inhibitorima BRAF te da imaju smanjenu proliferaciju (203). Mutacije u genu *RAS* također mogu dovesti do reaktivacije RAS/RAF/MAPK i pojave otpornosti. Pretjerano aktivni RAS može fosforilirati proteine ARAF i CRAF čime se kompenzira inhibicija proteina BRAF. Njegova aktivnost može potaknuti stvaranje dimera divljeg tipa proteina BRAF koji su neosjetljivi na terapiju, a u konačnici do ponovne reaktivacije RAS/RAF/MAPK (204). Gubitak tumor supresorskog gena *PTEN* zabilježen je kod 10-35% melanoma te se smatra čestim razlogom otpornosti na terapiju. Gubitkom njegove funkcije, dolazi do aktivacije PI3K/AKT koji je u uskoj interakciji s RAS/RAF/MAPK te se potiče proliferacija i rast stanica te blokiranje apoptoze. Gubitak negativnog regulatora proteina RAS, NF1 dovodi do konstitutivne aktivacije RAS/RAF/MAPK i pojave otpornosti na inhibitore BRAF. Pojačana ekspresija receptorskih

tirozinskih kinaza poput EGFR, ILGF1R, PDGFR i FGF omogućava primanje vanjskih signala kojima se potiče aktivacija signalne kaskade i smanjenje efikasnosti inhibitora (205). Mehanizmi koji se smatraju odgovornim za otpornost na inhibitore signalnog puta RAS/RAF/MAPK sumirani su u Tablici 1.2.

S obzirom na snažnu interakciju signalnih puteva u procesu stjecanja otpornosti, trenutni trendovi novih terapijskih pristupa idu u smjeru razvoja kombinirane terapije. Kombiniranom terapijom mogu se ciljati proteini različitih signalnih puteva za koje znamo da su u interakciji ili proteini istog signalnog puta koji su na različitim razinama regulacije. Primjerice, Dratkewitz i suradnici okarakterizirali su stanične linije melanoma rezistente na vemurafenib te pokazali da kombinirana terapija inhibitorima EGFR i MET (eng. *Hepatocyte growth factor receptor*) čini stanice ponovo osjetljive na terapiju (206). Nekoliko studija pokazalo je važnost interakcije HH-GLI i RAS/RAF/MAPK u otpornosti stanica na terapiju. U svom istraživanju, Dong i suradnici pokazali su da je aktivnost GLI1 u tumoru pluća nemalih stanica jedan od ključnih događaja koji dovodi do otpornosti na inhibitor EGFR, erlotinib, te predlažu za buduće terapijske smjernice kombiniranu terapiju inhibitorima GLI i EGFR (207). Faião-Flores i suradnici pokazali su da utišavanje aktivnosti GLI1 i GLI2 čini stanice melanoma rezistentne na vemurafenib ponovno osjetljivima na terapiju. Kao i u prethodnoj studiji, autori naglašavaju potrebu razvoja kombinirane terapije HH-GLI i RAS/RAF/MAPK (208).

**Tablica 2.1.** Inhibitori signalnog puta RAS/RAF/MAPK te mehanizmi koji se smatraju odgovornim za uspostavu rezistencije (209).

INHIBITOR RAS/RAF/MAPK	MEHANIZAM DJELOVANJA	MEHANIZAM ODGOVORAN ZA USPOSTAVU REZISTENCIJE
VEMURAFENIB	selektivni inhibitor <i>BRAF V600E</i> (kompeticija za ATP-vezno mjesto)	aktivacijske mutacije <i>NRAS</i> i <i>MEK</i> amplifikacija <i>BRAF/CRAF</i> alternativno prekradanje <i>BRAF</i> heterodimerizacija <i>RAF</i> pojačana ekspresija <i>RTK</i> gubitak <i>NF1</i> pojačana ekspresija <i>COT</i>
DABRAFENIB		
ENKORAFENIB		
TRAMETINIB	selektivni inhibitor <i>MEK1/2</i>	
BINIMETINIB	selektivni inhibitor <i>MEK1</i>	
KOBIMETINIB		
GEFITINIB	selektivni inhibitor <i>EGFR</i>	mutacija <i>EGFR T790M</i> amplifikacija gena ( <i>MET</i> i <i>HER2</i> ) gubitak <i>NF1</i> mutacija <i>BRAF</i>
LAFATINIB	selektivni inhibitor <i>EGFR</i> i <i>HER2</i>	aktivacija drugih signalnih puteva ( <i>AKT</i> , <i>mTOR</i> , <i>ER</i> ) amplifikacija gena ( <i>TRAPPC9</i> ), mutacije <i>HER2</i> u tirozin kinaznoj domeni

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

**Osnovna hipoteza** ovog istraživanja glasi da je interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i Hedgehog-GLI važna u procesu rezistencije na lijekove u staničnim linijama melanoma čovjeka.

Specifične hipoteze istraživanja su:

1. Uspostava rezistencije na GANT61 u staničnim linijama melanoma uzrokovati će promjenu aktivnosti signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI.
2. Proteini GLI1/2/3 imati će specifične ali i preklapajuće endogene transkripcijske mete.
3. Određene transkripcijske mete proteina GLI1/2/3 imati će ulogu u signalnom putu RAS/RAF/MAPK.
4. Neke transkripcijske ciljne mete proteina GLI1/2/3 biti će promijenjene u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama.

**Cilj** ove doktorske disertacije je ispitati interakciju signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i Hedgehog-GLI u procesu rezistencije na lijekove u staničnim linijama melanoma čovjeka.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Uspostaviti stanične linije melanoma rezistentne na kemijski spoj GANT61.
2. Ispitati aktivnost signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI na uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama.
3. Ispitati kako se uspostavom rezistencije na GANT61 mijenja odgovor uspostavljenih staničnih linija na druge lijekove.
4. Identificirati transkripcijske mete proteina GLI1/2/3 povezane sa signalnim putem RAS/RAF/MAPK u parentalnim staničnim linijama melanoma.
5. Ispitati ekspresiju transkripcijskih meta proteina GLI1/2/3 povezanih sa signalnim putem RAS/RAF/MAPK u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama.
6. Predložiti potencijalni mehanizam interakcije signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI u rezistentnim staničnim linijama melanoma.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1 Materijali

U sklopu doktorske disertacije korištene su 4 stanične linije. Linije Mel 224 i CHL-1 dobivene su na dar od prof.dr.sc Nede Slade (Institut Ruđer Bošković), dok su linije A375 i RPMI-7951 dobivene na dar od prof.dr.sc Andreje Ambriović Ristov (Institut Ruđer Bošković).

Stanične linije A375 i Mel 224 dobivene su iz primarnog melanoma kože, dok su linije RPMI-7951 i CHL-1 dobivene iz metastaza primarnog tumora. Porijeklo i mutacijski status gena *BRAF* i *NRAS* staničnih linija prikazani su u Tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Porijeklo korištenih staničnih linija i mutacijski status gena *BRAF* i *NRAS*.

STANIČNA LINIJA	TKIVO	MUTACIJSKI STATUS
CHL-1	Metastatski melanom (pleuralni izljev)	Divlji tip <i>BRAF/NRAS</i>
A375	Amelanotični melanom	<i>BRAF V600E</i> homozigot
RPMI-7951	Metastatski melanom (limfni čvor)	<i>BRAF V600E</i> heterozigot
Mel 224	Melanom (koža)	<i>NRAS Q61R</i> homozigot

### 3.2 Rad sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama odvija se u sterilnim uvjetima. Rukovanje s priborom koji se koristi za rad sa staničnim kulturama odvija se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka.

#### 3.2.1. Odmrzavanje stanica

Stanice su pohranjene u mediju za zamrzavanje (50% serum, 40% medij, 10% DMSO). Sadržaj ampule stavi se u 5 ml medija u kojem stanice rastu. U slučaju A375, CHL-1 i RPMI-7951 radi se o mediju DMEM (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), a Mel 224 mediju RPMI 1640 (Merck KGaA). Mediji su kompletirani dodatkom 10% FBS (goveđi fetalni serum, Merck KGaA), 1 mM natrijevog piruvata (Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), 1% streptomycin-penicilina (Gibco) te 4 mM L-glutamina (Gibco). Sadržaj se centrifugira na 300 x g 5 minuta na sobnoj temperaturi, talog stanica resuspendira u 10 ml kompletnog medija te prebaci u petrijevku promjera 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka).

#### 3.2.2 Presađivanje i održavanje stanica u kulturi

Stanicama u kulturi medij se mijenja svaka dva do tri dana ovisno o dinamici rasta pojedine linije. Pipetom se ukloni sav medij iz petrijevke te doda 10 ml svježeg kompletnog medija. Kada stanice prekriju cijelu površinu za rast tj. postanu više od 90 % konfluentne, potrebno ih je presađiti. U tom slučaju također se prvo ukloni sav medij te nakon toga stanice isperu s 5 ml fosfatnog pufera PBS (eng. *Phosphate-Buffered Saline*; 1,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 136 mM NaCl,

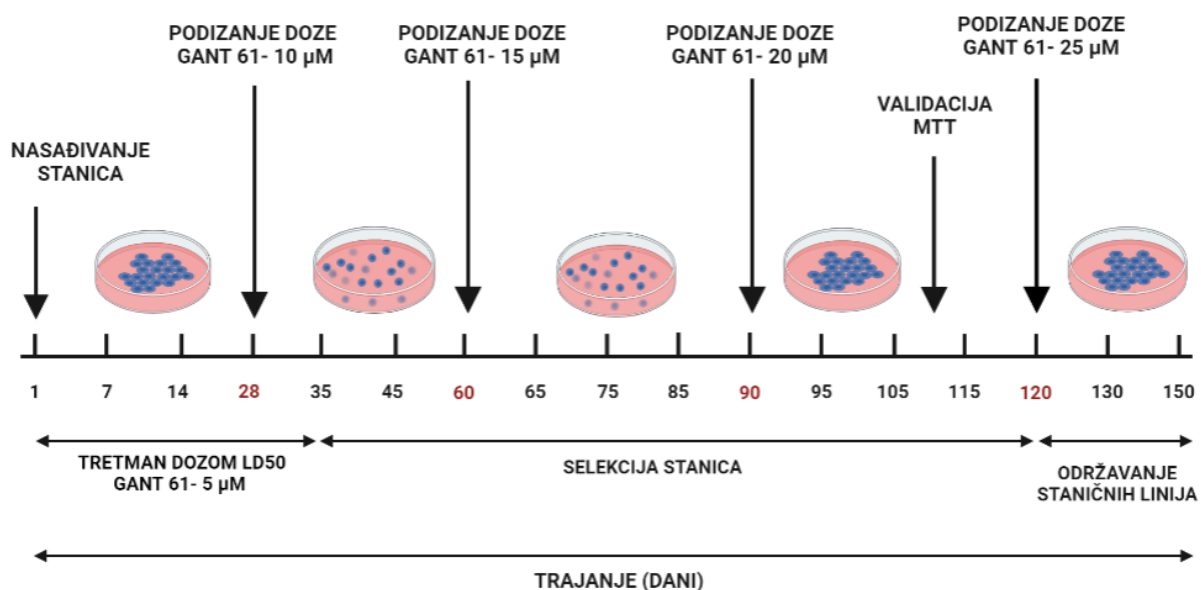
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, pH 7,2). Nakon ispiranja, na stanice se doda 1 ml tripsina (0,05 % w/v) s dodatkom 1 mM EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) te ostavi nekoliko minuta dok se stanice vidljivo ne odlijepe (proces tripsinizacije). Kada se stanice odvoje od podloge, doda se medij, otopina resuspendira i dio otopine vrati u petrijevku. Stanice se za potrebe različitih eksperimenata nasađuju u plastične pločice različitih formata te ih je prethodno izbrojati. Stanice se broje u Neubauerovoj komorici te se pritom moraju 5 puta razrijediti u metilenskom modrilu koje omogućava da razlikujemo žive od mrtvih stanica. Pomoću formule  $(\text{br.stanica}/0,4) \times 5 \times 10^3$  izračuna se broj stanica po mililitru medija u uzorku.

### 3.2.3 Zamrzavanje stanica

Stanice se zamrzavaju kada su optimalne gustoće (80-90 % konfluentne). Postupak zamrzavanja započinje tripsinizacijom stanica, stanice se potom inkubiraju pola sata na ledu kako bi se polako ohladile. Sadržaj se centrifugira na 300 x g 5 minuta u centrifugi ohlađenoj pri +4°C te potom resuspendira u medij za zamrzavanje. Krio-ampula se pohranjuje u hladnjak na -80°C te za potrebe duljeg skladištenja prebacuje u spremnik s tekućim dušikom.

### 3.2.4 Uspostava rezistentnih staničnih linija

Za uspostavu rezistentnih staničnih linija korištene su stanične linije A375, Mel 224, CHL-1 i RPMI-7951. Stanične linije nasade se u petrijevke promjera 10 cm do popunjenosti 50 %. Dvadeset četiri sata nakon nasađivanja, stanice se tretiraju inhibitorom GANT61 (Selleck Chemicals, Houston, Texas, SAD) (2-25 µM) te ostave u tretmanu sljedećih 48 sati.



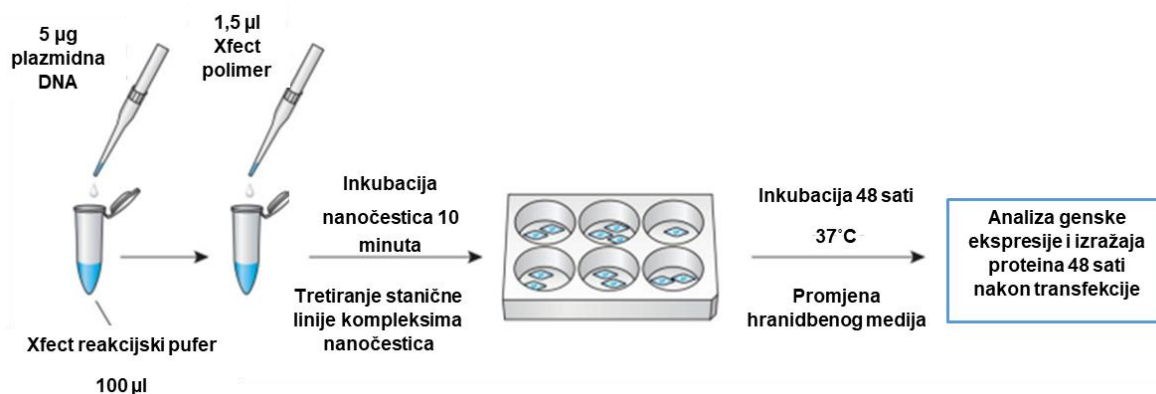
**Slika 3.1.** Shema izrade rezistentnih staničnih linija (shema napravljena na platformi Biorender <https://biorender.com/>).



Nakon 48 sati, ovisno o konfluentnosti stanica, stanicama se promijeni medij ili napravi tripsinizacija. Stanice se 24 sata nakon pripreme ponovo tretiraju navedenim inhibitorima. Ovaj postupak ponavlja se sve dok stanice normalno ne preživljavaju koncentracije koje su barem 1-2 puta veće od doze LD50 (doza spoja koja inače ubija 50 % stanične populacije). Doza korištenih inhibitora povećava se ovisno o tome kako stanice reagiraju na tretman (Slika 3.1) te se raspon doza inhibitora prethodno odredi na temelju rezultata testa MTT.

### 3.2.5 Transfekcija stanica

Transfekcija stanica koristila se za potrebe validacije odabranih potencijalnih transkripcijih meta proteina GLI1/2/3 koje su otkrivene metodom native kromatinske precipitacije uz sekvenciranje. U tu svrhu, odabrane stanične linije: A375, Mel 224 i CHL-1 transfeciraju se ekspresijskim plazmidima za proteine GLI1 (pcDNA4NLSMTGLI1, dobiveno na dar od prof. Fritz Aberger, Fakultet prirodnih znanosti, Austrija), GLI2 i GLI3 (p4TO6MTGLI2, pcDNA4/TO/GLI3richtig, oba dobivena na dar od prof. Milene Stevanović, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Srbija). Za transfekciju stanica koristi se protokol proizvođača kompleta Xfect RNA Transfection Reagent (Clontech, Mountain View, CA, SAD). Stanične linije se 24 sata prije transfekcije nasade u pločice sa 6 bunarića tako da u svakom bunariću bude  $3 \times 10^5$  stanica. Na dan transfekcije, u sterilnoj epruveti potrebno je promiješati 5 µg plazmidne DNA i 100 µl Xfect pufera. Sadržaj se vorteksira pet sekundi, nakon čega se doda 1,5 µl polimera Xfect, te se ponovo sadržaj vorteksira nekoliko sekundi kako bi se sve komponente dobro izmiješale. Sadržaj epruvete inkubira se 10 minuta pri sobnoj temperaturi te potom 100 µl sadržaja nakapa u bunariće s 1 ml svježeg medija bez dodatka seruma. Stanice se inkubiraju 4 sata nakon čega se isti ukloni i doda 2 ml kompletnog medija (Slika 3.2). Četrdeset osam sati nakon transfekcije, talozi stanica skupljaju se za izdvajanje RNA i proteina.



**Slika 3.2.** Protokol transfekcije stanica uporabom transfekcijskog reagensa Xfect (Clontech) (preuzeto i prilagođeno prema [www.clontech.com](http://www.clontech.com)).

### 3.2.6 Test MTT

Test MTT korišten je za praćenje rasta i preživljenja stanica nakon tretmana GANT61 (Selleck Chemicals), ciklopaminom (CYC) (Selleck Chemicals), litijevim kloridom (LiCl), SAG (Selleck Chemicals), arsenovim triksidom (ATO) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), sonidegibom (SDG) (Selleck Chemicals) te vismodegibom (VDG) (Selleck Chemicals). Stanice se nasade u pločice s 96 bunarića tako da u svakom bunariću bude  $2 \times 10^3$  stanica u ukupnom volumenu od 100  $\mu$ l medija. Dvadeset četiri sata nakon nasađivanja, stanice se tretiraju sa 100  $\mu$ l kemijskih spojeva koji se testiraju u različitim koncentracijama. U tablicama 3.2 i 3.3 prikazan je način pripreme spojeva u mediju u kojem se stanice uzgajaju, no bez dodatka seruma. Na dan očitavanja, stanicama se doda otopina MTT u mediju bez seruma konačne koncentracije 1 mg/ml. Pločica se inkubira zaštićena od svijetla 4 sata u inkubatoru pri 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon inkubacije od 4 sata, u bunariće se doda 160  $\mu$ l DMSO. Obojenost bunarića mjeri se fluorimetrijski na aparatu Labsystem Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific) pri absorbanciji od 570 nm.

**Tablica 3.2** Priprema serijskih razrjeđenja kemijskih spojeva arsenov triksid za test MTT.

ARSENOV TRIKSID STOCK 50 mM	VOLUMEN MEDIJA	PRIPREMA RAZRIJEĐENJA	KOEFICIJENT RAZRIJEĐENJA	RADNA KONCENTRACIJA SPOJA	VOLUMEN NANESEN U BUNARIĆ	KONAČNA KONCENTRACIJA SPOJA U BUNARIĆU
A	1,5 ml	7,5 $\mu$ l stock u A	0	250 $\mu$ M	100 $\mu$ l	125 $\mu$ M
B	0,75 ml	0,75 ml A u B	2	125 $\mu$ M	100 $\mu$ l	62,5 $\mu$ M
C	1,2 ml	0,3 ml B u C	5	25 $\mu$ M	100 $\mu$ l	12,5 $\mu$ M
D	0,75 ml	0,75 ml C u D	2	12,5 $\mu$ M	100 $\mu$ l	6,25 $\mu$ M
E	1,2 ml	0,3 ml D u E	5	2,5 $\mu$ M	100 $\mu$ l	1,25 $\mu$ M
F	0,75 ml	0,75 ml E u F	2	1,25 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,625 $\mu$ M
G	1,2 ml	0,3 ml F u G	5	0,25 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,125 $\mu$ M
H	0,75 ml	0,75 ml G u H	2	0,125 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,0625 $\mu$ M
I	1,2 ml	0,3 ml H u I	5	0,0625 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,03125 $\mu$ M

**Tablica 3.3.** Priprema tretmana kemijskih spojeva GANT61, ciklopamin, litijev klorid, SAG, sonidegib i vismodegib za test MTT.

	Početna koncentracija spoja	Volumen spoja	Volumen medija	Radna koncentracija spoja	Volumen nanesen u bunarić	Konačna koncentracija spoja u bunariću
GANT61	5 mM	1,5 $\mu$ l	1,5 ml	5 $\mu$ M	100 $\mu$ l	2,5 $\mu$ M
	5 mM	3 $\mu$ l	1,5 ml	10 $\mu$ M	100 $\mu$ l	5 $\mu$ M
	5 mM	4,5 $\mu$ l	1,5 ml	15 $\mu$ M	100 $\mu$ l	7,5 $\mu$ M
	5 mM	6 $\mu$ l	1,5 ml	20 $\mu$ M	100 $\mu$ l	10 $\mu$ M
	5 mM	7,5 $\mu$ l	1,5 ml	25 $\mu$ M	100 $\mu$ l	12,5 $\mu$ M
	5 mM	9 $\mu$ l	1,5 ml	30 $\mu$ M	100 $\mu$ l	15 $\mu$ M
	5 mM	12 $\mu$ l	1,5 ml	40 $\mu$ M	100 $\mu$ l	20 $\mu$ M
	5 mM	15 $\mu$ l	1,5 ml	50 $\mu$ M	100 $\mu$ l	25 $\mu$ M
	5 mM	18 $\mu$ l	1,5 ml	60 $\mu$ M	100 $\mu$ l	30 $\mu$ M
CIKLOPAMIN	1 mg/ml	0,75 $\mu$ l	1,5 ml	0,5 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	0,25 $\mu$ g/ml
	1 mg/ml	1,5 $\mu$ l	1,5 ml	1 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	0,5 $\mu$ g/ml
	1 mg/ml	2,25 $\mu$ l	1,5 ml	1,5 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	0,75 $\mu$ g/ml
	1 mg/ml	3 $\mu$ l	1,5 ml	2 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	1 $\mu$ g/ml
	1 mg/ml	6 $\mu$ l	1,5 ml	4 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	2 $\mu$ g/ml
	1 mg/ml	9 $\mu$ l	1,5 ml	6 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	3 $\mu$ g/ml
	1 mg/ml	12 $\mu$ l	1,5 ml	8 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	4 $\mu$ g/ml
	1 mg/ml	15 $\mu$ l	1,5 ml	10 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	5 $\mu$ g/ml
1 mg/ml	18 $\mu$ l	1,5 ml	12 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	6 $\mu$ g/ml	

**Tablica 3.3 (nastavak).** Priprema tretmana kemijskih spojeva GANT61, ciklopamin, litijev klorid, SAG, sonidegib i vimodegib za test MTT.

	Početna koncentracija spoja	Volumen spoja	Volumen medija	Radna koncentracija spoja	Volumen nanesen u bunarić	Konačna koncentracija spoja u bunariću
LITIJ KLORID	1 M	3 $\mu$ l	1,5 ml	2 mM	100 $\mu$ l	1 mM
	1 M	7,5 $\mu$ l	1,5 ml	5 mM	100 $\mu$ l	2,5 mM
	1 M	15 $\mu$ l	1,5 ml	10 mM	100 $\mu$ l	5 mM
	1 M	30 $\mu$ l	1,5 ml	20 mM	100 $\mu$ l	10 mM
	1 M	45 $\mu$ l	1,5 ml	30 mM	100 $\mu$ l	15 mM
	1 M	60 $\mu$ l	1,5 ml	40 mM	100 $\mu$ l	20 mM
	1 M	75 $\mu$ l	1,5 ml	50 mM	100 $\mu$ l	25 mM
	1 M	90 $\mu$ l	1,5 ml	60 mM	100 $\mu$ l	30 mM
	1 M	120 $\mu$ l	1,5 ml	80 mM	100 $\mu$ l	40 mM
SAG	400 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l	1,5 ml	0,2 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,1 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	1,875 $\mu$ l	1,5 ml	0,5 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,25 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	3,75 $\mu$ l	1,5 ml	1 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	7,5 $\mu$ l	1,5 ml	2 $\mu$ M	100 $\mu$ l	1 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	11,25 $\mu$ l	1,5 ml	3 $\mu$ M	100 $\mu$ l	1,5 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	15 $\mu$ l	1,5 ml	4 $\mu$ M	100 $\mu$ l	2 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	18,75 $\mu$ l	1,5 ml	5 $\mu$ M	100 $\mu$ l	2,5 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	22,5 $\mu$ l	1,5 ml	6 $\mu$ M	100 $\mu$ l	3 $\mu$ M
	400 $\mu$ M	26,25 $\mu$ l	1,5 ml	7 $\mu$ M	100 $\mu$ l	3,5 $\mu$ M
SONIDEGIB	5 mM	0,3 $\mu$ l	1,5 ml	1 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
	5 mM	0,6 $\mu$ l	1,5 ml	2 $\mu$ M	100 $\mu$ l	1 $\mu$ M
	5 mM	1,8 $\mu$ l	1,5 ml	6 $\mu$ M	100 $\mu$ l	3 $\mu$ M
	5 mM	3 $\mu$ l	1,5 ml	10 $\mu$ M	100 $\mu$ l	5 $\mu$ M
	5 mM	6 $\mu$ l	1,5 ml	20 $\mu$ M	100 $\mu$ l	10 $\mu$ M
	5 mM	12 $\mu$ l	1,5 ml	40 $\mu$ M	100 $\mu$ l	20 $\mu$ M
	5 mM	18 $\mu$ l	1,5 ml	60 $\mu$ M	100 $\mu$ l	30 $\mu$ M
	5 mM	24 $\mu$ l	1,5 ml	80 $\mu$ M	100 $\mu$ l	40 $\mu$ M
	5 mM	30 $\mu$ l	1,5 ml	100 $\mu$ M	100 $\mu$ l	50 $\mu$ M
VISIMODEGIB	5 mM	0,3 $\mu$ l	1,5 ml	1 $\mu$ M	100 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
	5 mM	0,6 $\mu$ l	1,5 ml	2 $\mu$ M	100 $\mu$ l	1 $\mu$ M
	5 mM	1,8 $\mu$ l	1,5 ml	6 $\mu$ M	100 $\mu$ l	3 $\mu$ M
	5 mM	3 $\mu$ l	1,5 ml	10 $\mu$ M	100 $\mu$ l	5 $\mu$ M
	5 mM	6 $\mu$ l	1,5 ml	20 $\mu$ M	100 $\mu$ l	10 $\mu$ M
	5 mM	12 $\mu$ l	1,5 ml	40 $\mu$ M	100 $\mu$ l	20 $\mu$ M
	5 mM	18 $\mu$ l	1,5 ml	60 $\mu$ M	100 $\mu$ l	30 $\mu$ M
	5 mM	24 $\mu$ l	1,5 ml	80 $\mu$ M	100 $\mu$ l	40 $\mu$ M
	5 mM	30 $\mu$ l	1,5 ml	100 $\mu$ M	100 $\mu$ l	50 $\mu$ M
SALIRASIB	10 mM	0,32 $\mu$ l	1,5 ml	3,2 $\mu$ M	100 $\mu$ l	1,6 $\mu$ M
	10 mM	0,62 $\mu$ l	1,5 ml	6,2 $\mu$ M	100 $\mu$ l	3,1 $\mu$ M
	10 mM	1,26 $\mu$ l	1,5 ml	12,6 $\mu$ M	100 $\mu$ l	6,3 $\mu$ M
	10 mM	2,5 $\mu$ l	1,5 ml	25 $\mu$ M	100 $\mu$ l	12,5 $\mu$ M
	10 mM	5 $\mu$ l	1,5 ml	50 $\mu$ M	100 $\mu$ l	25 $\mu$ M
	10 mM	10 $\mu$ l	1,5 ml	100 $\mu$ M	100 $\mu$ l	50 $\mu$ M
	10 mM	20 $\mu$ l	1,5 ml	200 $\mu$ M	100 $\mu$ l	100 $\mu$ M
	10 mM	40 $\mu$ l	1,5 ml	400 $\mu$ M	100 $\mu$ l	200 $\mu$ M

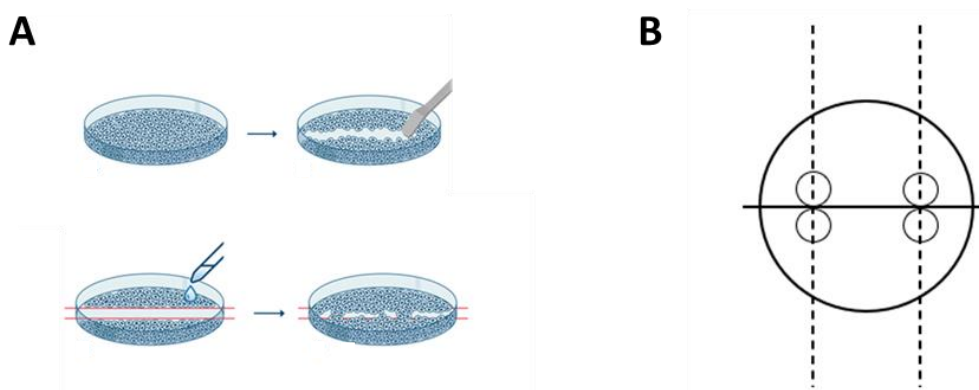
### 3.2.7 Analiza sposobnosti formiranja kolonija stanica

Analiza sposobnosti formiranja kolonija radi se kako bi se karakterizirale uspostavljene rezistentne stanične linije, odnosno ispitalo kako uspostava rezistencije utječe na sposobnost formiranja kolonija u odnosu na ishodišne linije. Kako bi se analizirala sposobnost formiranja kolonija (eng. *Colony forming assay*), stanice se nasade u pločice sa 6 bunarića tako da u svakom bunariću bude  $1 \times 10^3$  stanica. Dvadeset četiri sata nakon nasađivanja, stanice se tretiraju s četiri različite doze kemijskih spojeva GANT61 (Selleck Chemicals), arsenovog trioksida (Sigma Aldrich), litijevog klorida te ciklopamina (Selleck Chemicals). Rast kolonija prati se dva tjedna, a stanicama se svaka tri dana doda svježi medij s tretmanom. Nakon dva

tjedna, stanicama se odstrani medij te se isperu 3 puta u PBS-u. Stanice se nakon toga fiksiraju u 3,6 % formaldehidu 10 minuta pri sobnoj temperaturi, te potom ponovo isperu 3 puta u PBS. Kolonije se vizualiziraju 1 %-tnom (w/v) otopinom kristal ljubičasto 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Na samom kraju ukloni se boja te se bunarići isperu vodom dok se podloga ne odboja, a kolonije ostanu jasno ljubičasto obojene. Kolonije se analiziraju u programu ImageJ.

### 3.2.8 Analiza migracijske sposobnosti stanica

Analiza migracijske sposobnosti radi se za karakterizaciju uspostavljenih rezistentnih staničnih linija, odnosno kako bi se ispitalo utječe li uspostava rezistencije na migracijsku sposobnost stanica. Metoda se zasniva na nasađivanju stanica u visokoj konfluenciji i stvaranju “rane”, odnosno ureza koje stanice trebaju popuniti (eng. *Wound healing assay*). Stanice se nasade u pločice s 24 bunarića tako da je u svakom bunariću  $2 \times 10^5$  stanica. Dvadeset četiri sata nakon nasađivanja ukloni se medij i doda svježi medij bez seruma. Sutradan, u svakom bunariću naprave se dva ureza s najmanjim plastičnim nastavkom pipete (Slika 3.3A), bunarići isperu PBS-om te dodaju tretmani kemijskim spojevima GANT61  $10 \mu\text{M}$  (Selleck Chemicals), arsenov trioksid  $1 \mu\text{M}$  (Sigma Aldrich), litijev klorid  $20 \text{ mM}$  te ciklopamin  $2 \mu\text{g/ml}$  (Selleck Chemicals) pripremljeni u mediju bez seruma. Svaki bunarić potom se fotografira na četiri položaja (Slika 3.3 B) na dan tretmana te 18 i 24 sata nakon te analizira u programu ImageJ s dodatkom *Wound Healing Tool* koji identificira rubove ureza i daje podatak o površini reza.



**Slika 3.3.** Analiza migracijske sposobnosti stanica. A) Prikaz nasađivanja stanica i stvaranja ureza kojeg stanice moraju popuniti. B) Izgled bunarića. Isprekidane linije označavaju mjesta ureza. Zaokružena mjesta su točne lokacije koje se fotografiraju na 0.dan, 18 i 24 sata nakon tretmana. Puna horizontalna linija služi za orijentaciju kako bi se svaki put fotografirale iste lokacije bunarića (preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.reactionbiology.com/services/cell-based-assays/migration-assay-wound-healing-assay-and-oris-assay>).

### 3.3 Analiza ekspresije gena, lncRNA i miRNA

#### 3.3.1 Izdvajanje RNA iz stanica

Za izolaciju RNA koristi se otopina NucleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Talog stanica dobro se resuspendira pipetom u 500 µl NuclOZOL-a, nakon čega se doda 200 µl vode bez RNAza. Nakon inkubacije od 5 minuta pri sobnoj temperaturi, uzorci se centrifugiraju 15 minuta na 16000 x g. Supernatant u kojem se nalazi RNA prebaci se u čistu mikroeprevetu od 1,5 ml. Za precipitaciju RNA, doda se 700 µl izopropanola, te inkubira 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Uzorci se ponovo centrifugiraju 10 minuta na 8000 x g. Talog RNA se ispere u 500 µl 70 %-tnog etanola i centrifugira 3 minute na 3000 x g na sobnoj temperaturi. Isti postupak ispiranja u 70 %-tnom etanolu ponovi se još dva puta. Talog RNA osuši se nekoliko minuta, otopi u 30 µl pufera TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) te pohrani u hladnjak na -80°C.

#### 3.3.2 Mjerenje koncentracije RNA

Koncentracija RNA mjeri se na spektrofotometru NanoPhotometer N60 (Implen, München, Njemačka). Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm te 280 nm. Omjer  $A_{260/280}$  pokazuje čistoću RNA te što je vrijednost bliža 2, to je uzorak RNA čišći. Omjer  $A_{260/230}$  također pokazuje čistoću uzorka te se u idealnim uvjetima kreće u rasponu vrijednosti 2,0 – 2,2.

#### 3.3.3 Reverzna transkripcija

Za reakciju reverzne transkripcije koriste se dva kompleta, High-Capacity cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific) i miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Komplet High-Capacity cDNA synthesis koristi se za sintezu cDNA protein-kodirajućih gena te gena koji kodiraju za duge nekodirajuće RNA (lncRNA, eng. *Long Noncoding RNAs*). Od ukupnog volumena osnovne reakcije od 25 µl, na reakcijsku smjesu otpada volumen od 8,5 µl. Reakcijska smjesa sastoji se od: 10 x RT  $MgCl_2$  pufera, 25 x dNTP Mix (100 mM), 10 x RT nasumičnih početnica, MultiScribe™ reverzne transkriptaze te inhibitora RNAza. Ostatak volumena od 16,5 µl sačinjava 500 ng RNA koja je otopljena u vodi bez RNAza (Tablica 3.4).

**Tablica 3.4.** Prikaz komponenti reakcijske smjese za reverznu transkripciju protein- kodirajućih gena i gena za lncRNA.

KOMPONENTA	POČETNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN ZA REAKCIJU 25 $\mu$ l
10 x pufer	10 x	1 x	2,5
d NTP	100 mM	4 mM	1
nasumične početnice	10 x	1 x	2,5
reverzna transkriptaza	50 U/ $\mu$ l	62,5 U	1,25
inhibitor RNAza	20 U/ $\mu$ l	25 U	1,25

Reakcija se provodi u uređaju za PCR GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) prema sljedećem programu:

25°C 10:00 min

37°C 120:00 min

85°C 5:00 min

4°C  $\infty$

Dobivena cDNA pohranjuje se u hladnjaku pri -20°C do korištenja.

Za sintezu cDNA gena koji kodiraju za miRNA (eng. *micro RNAs*) koristi se komplet miRCURY LNA RT Kit. Od ukupnog volumena osnovne reakcije od 10  $\mu$ l, na reakcijsku smjesu otpada volumen od 8  $\mu$ l. Reakcijska smjesa sastoji se od: pufera 5 x miRCURY SYBR RT BUFFER, enzima 10x miRCURY RT te vode bez RNAza. Ostatak volumena od 2  $\mu$ l sačinjava 100 ng RNA koja je u reakcijskoj smjesi konačne koncentracije 10 ng/ $\mu$ l. (Tablica 3.5).

**Tablica 3.5.** Prikaz komponenti reakcijske smjese za reverznu transkripciju gena koji kodiraju za miRNA.

KOMPONENTA	POČETNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN ZA REAKCIJU 10 $\mu$ l
pufer 5 x miRCURY	5 x	1 x	2 $\mu$ l
enzim 10 x miRCURY	10 x	1 x	1 $\mu$ l
voda bez RNAza	/	/	5 $\mu$ l

Reakcija se provodi u uređaju za PCR GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) prema sljedećem programu:

25°C 10:00 min  
42°C 60:00 min  
95°C 5:00 min  
4°C ∞

Dobivena cDNA pohranjuje se u hladnjaku na -20°C do korištenja.

### 3.3.4 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Za analizu genske ekspresije potencijalnih ciljnih meta proteina GLI te karakterizaciju uspostavljenih rezistentnih staničnih linija napravljena je kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR). Za analizu ekspresije protein-kodirajućih gena te gena koji kodiraju za lncRNA, reakcijska smjesa sastoji se od SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD), početnica F (eng. *Forward*, 0,03 mM), početnica R (eng. *Reversed*, 0,03 mM) te vode do ukupnog volumena 9 µl po uzorku. Na reakcijsku smjesu koja je ispipetirana u bunariće doda se 1 µl uzorka cDNA. Normalizacija se radi prema referentnom genu, *RPLP0* ili *TBP*. Nukleotidni slijedovi početnica koje su se koristile nalaze se u Tablici 3.6. Kvantitativni PCR radi se na instrumentu Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad). Reakcija se odvija po sljedećim uvjetima: 95°C 30 s, a zatim u 40 ciklusa (95°C 5 s, 61°C 5 s), te se na kraju analizira krivulja mekšanja u rasponu od 70°C do 95°C.

**Tablica 3.6.** Nukleotidni slijedovi početnica koje su se koristile u eksperimentima. F označava “forward” odnosno 5'-3' smjer sekvence gena, a R “reverse” odnosno 3'-5' smjer.

GEN	NUKLEOTIDNA SEKVENCA	REFERENCA
<i>MTDH</i>	F: 5'-TTACCACCGAGCAACTTACAAC-3'	(210)
	R: 5'-ATTCCAGCCTCCTCCATTGAC-3'	
<i>RHEB</i>	F: 5'-CAATTTGTGGACTCCTAC-3'	(211)
	R: 5'-ATATCTATGGAGTATGTC-3'	
<i>CD63</i>	F: 5'-CTACCCCTGGCTCTCTGTTG-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-TCGGGTAATTCTCCATCTGC-3'	
<i>MERTK</i>	F: 5'-ACAATGACAAAGGGCTGACC-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-CTGAATGCTGCAATTCCTGA-3'	
<i>FOXO3a</i>	F: 5'-ATGGGAGCTTGAATGTGAC-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-GAGAGCAGATTTGGCAAAGG-3'	
<i>c-MYC</i>	F: 5'-TTTCGGGTAGTGGAAAACCA-3'	(212)
	R: 5'-CACCGAGTCGTAGTCGAGGT-3'	
<i>SOX4</i>	F: 5'-ACCGGGACCTGGATTTTAAC-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-AAACCAGGTTGGAGATGCTG-3'	
<i>SPRY4</i>	F: 5'-AGAAGTGTACTGAAGGGACTGGAG-3'	(213)
	R: 5'-GTGTGTAGACCACCAAGATCACC-3'	
<i>SIRT1</i>	F: 5'-TGCTGGCCTAATAGAGTGGCA-3'	(214)
	R: 5'-CTCAGCGCCATGGAAAATGT-3'	
<i>SOS1</i>	F: 5'-TGGTGTCTTGAGGTTGTCA-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-CTCAGGGTTGCCTTCTTCTG-3'	
<i>GNAQ</i>	F: 5'-TCAGAGCCATGGACACACTC-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-ACGCGGTCCAAGTCATTAAG-3'	
<i>p38 α</i>	F: 5'-GGGGCAGATCTGAACAACAT-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-GAGCCAGTCCAAAATCCAGA-3'	
<i>BCL9</i>	F: 5'-CCATGATGCTATCAAGACTGTG-3'	(215)
	R: 5'-CGAGGATTCTGTGTATTAATGC-3'	
<i>CDC6</i>	F: 5'-GAGCCAAGAAGGAGCACAAGATT -3'	(216)
	R: 5'-CTTCCAAGAGCCCTGAAAGTGAC -3'	
<i>JUND</i>	F: 5'-CAAACCCTGCCTTTCTTTAC-3'	(217)
	R: 5'-GGCGAACCAAGGATTACAAA-3'	
<i>CDKN2C</i>	F: 5'-ACGTCAATGCACAAAATGGA-3'	(218)
	R: 5'-TCATGAATGACAGCGAAACC-3'	
<i>SPRY2</i>	F: 5'-CTCGGCCCCAGAACGTGATT-3'	(219)
	R: 5'-GGCAAAAAGAGGGACATGACAC-3'	
<i>SOX10</i>	F: 5'-ATGAACGCCTTCATGG TGTGGG-3'	(220)
	R: 5'-CGCTTGTCACTTTCGTTCCAGCAG-3'	



**Tablica 3.6 (nastavak).** Nukleotidni slijedovi početnica koje su se koristile u eksperimentima. F označava "forward" odnosno 5'-3' smjer sekvence gena, a R "reverse" odnosno 3'-5' smjer.

GEN	NUKLEOTIDNA SEKVENCA	REFERENCA
FLG	F: 5'-GGCAAATCCTGAAGAATCCA-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-TGCTTTCTGTGCTTGTGTCC-3'	
JAK2	F: 5'- TCTTTCTTTGAAGCAGCAAG-3'	(221)
	R: 5'-CCATGCCAACTGTTTAGCAA-3'	
GLI1	F: 5'- CTTGTGGTCCCCATGACTCT-3'	dizajn na platformi Primer3
	R- 5'- GTTGGGGCTGGACATATCAC-3'	
PTCH1	F: 5' TCCTCGTGTGCGCTGTCTTCTTC 3'	(222)
	R: 5' CGTCAGAAAGGCCAAAGCAACGTGA 3'	
RAB34	F: 5'-ATTACAAGGCCACCATTGGA-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-TGCAATGCATTTGAACCTCT-3'	
SOX2	F: 5'-GAGCTTTGCAGGAAGTTTGC-3'	(223)
	R: 5'-GCAAGAAGCCTCTCCTTGAA-3'	
NANOG	F: 5'-ACCTGGCTGCCGTCTCTGG-3'	(224)
	R: 5'-AGCAAAGCCTCCCAATCCCAAACA-3'	
OCT4	F: 5'-TTTTGGTACCCAGGCTATG-3'	(225)
	R: 5'-GCAGGCACCTCAGTTTGAAT-3'	
GLI2	F: 5'-GCCATCAAGACCGAGAGCTC-3'	(226)
	R: 5'-CGGCCCATGAGCAGGAATCC-3'	
GLI3	F: 5'-CACTACCTCAAAGCGGGAAG-3'	(227)
	R: 5'-TGTTGGACTGTGTGCCATTT-3'	
SUFU	F: 5'-AACAGCAAACCTGTCCTTCC-3'	(228)
	R: 5'-TCAGATGTACGCTCTCAAGC-3'	
SHH	F: 5'-GAAAGCAGAGAACTCGGTGG-3'	dizajn na platformi Primer3
	R: 5'-GGTAAGTGAGGAAGTCGCTG-3'	
GSK3 $\beta$	F: 5'-GGAGAAGTGGTCGCCATCAAG-3'	(229)
	R: 5'-ACATTGGGTTCTCCTCGGACC-3'	
CMYC	F: 5'-TTCTAAGAGAAATGTCCTGAGCAATC-3'	(212)
	R: 5'-TCAAGACTCAGCCAAGGTTGTG-3'	
MMP9	F: 5'-CACTGTCCACCCCTCAGAGC-3'	(230)
	R: 5'-GCCACTTGTGCGCGATAAGG-3'	
MMP2	F: 5'-CCCCAAAACGGACAAAGAG-3'	(231)
	R: 5'-CACGAGCAAAGGCATCATCC-3'	
VIMENTIN	F: 5'-TGTCCAAATCGATGTGGATGTTT-3'	(232)
	R: 5'-TTGTACCATTCTTCTGCCTCCTG-3'	
CDH1	F: 5'-CCCGGGACAACGTTTATTAC-3'	(233)
	R: 5'-GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC-3'	
SMO	F: 5'-CTGGTACGAGGACGTGGAGG-3'	(234)
	R: 5'-AGGGTGAAGAGCGTGCAGAG-3'	
RPLP0	F: 5'-GGCACCATTGAAATCCTGAGTGATGTG-3'	(235)
	R: 5'-TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC-3'	
TBP	F: 5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3'	(236)
	R: 5'-TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC-3'	

Za analizu ekspresije gena koji kodiraju za miRNA koristi se komplet miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Reakcijska smjesa sastoji se od mješavine specifične za svaku miRNA 2 x miRCURY SYBR Master Mix, te vode do ukupnog volumena 7  $\mu$ l po uzorku. Mješavina početnica za svaku miRNA prethodno dizajnira se i naruči (Qiagen) (Tablica 3.7). Na reakcijsku smjesu koja se ispipetira u bunariće doda se 3  $\mu$ l 10 puta prethodno razrijeđene cDNA. Kao referentni geni korištene se miRNA U6 te SNORD48.

**Tablica 3.7.** Popis naručenih mješavina početnica miRNA.

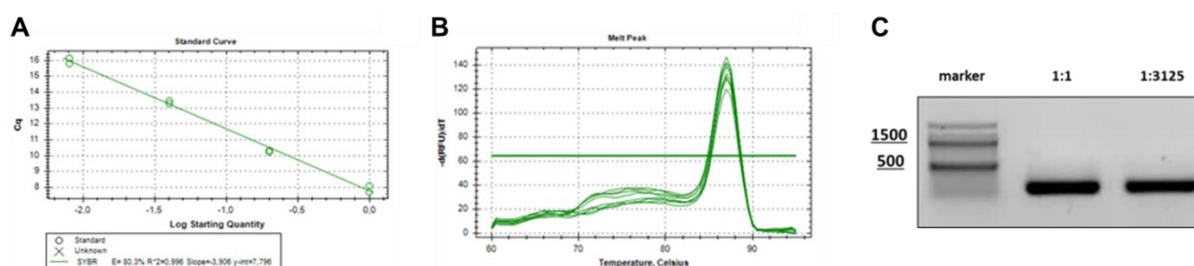
miRNA	KATALOŠKI BROJ	LOT BROJ
U6	YP00203907	202003160003-2
SNORD48	YP00203903	201803080071-5
hsa-miR-377-3p	YP00204733	201705050398-1
hsa-miR-377-5p	YP00205428	201705190365-1
hsa-miR-3065-3p	YP02114101	201908200008-1
hsa-miR-3065-5p	YP021106617	201903280132-1
hsa-miR-1231	YP02114733	201710180233-1
hsa-miR-1299	YP02114891	201710180258-1
hsa-miR-1302	YP02115302	201903280141-1
hsa-miR-3194-3p	YP02119067	201909170177-1
hsa-miR-3194-5p	YP02101080	00600723-1
hsa-miR-3648	YP02107125	00600724-1
hsa-miR-4477a	YP02118912	00600725-1

### 3.3.5 Optimizacija početnica za qPCR

Kako bi se analizirala ekspresija gena od interesa, potrebno je odabrati početnice koje umnožavaju željeni genski fragment. U nekim slučajevima, odgovarajuće početnice nije moguće naći u već objavljenoj literaturi te se stoga moraju dizajnirati uz pomoć *on line* dostupnih alata i optimizirati kako bi se provjerilo umnožavaju li zaista fragment od interesa. Za dizajn početnica, u sklopu ove doktorske disertacije korišten je alat Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). Platforma Primer3 na temelju željenog nukleotidnog slijeda i karakteristika početnica (duljina, temperatura taljenja, udio gvanina i citozina) automatski predlaže nekoliko opcija početnica.

U svrhu optimizacije početnica također se koristila metoda kvantitativnog PCR-a. Od dobivene cDNA napravi se šest serijskih razrjeđenja u vodi: 1) nerazrijeđeni uzorak, 2) 1:5, 3) 1:25, 4) 1:125, 5) 1:625 te 6) 1:3125. Reakcijska smjesa za kvantitativni PCR pripremi se koristeći početnice koje želimo analizirati kao što je prethodno opisano. Reakcija se odvija na instrumentu Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) po sljedećim uvjetima: 95°C 30 s, a zatim u 40 ciklusa (95°C 5 s, 59°C-62°C\* 5 s) te se na kraju analizira krivulja mekšanja u rasponu od 70°C do

95°C. Temperatura prijanja i ekstenzije označena s (\*) ovisno o dizajnu početnica prilagođava se dok se ne dobiju optimalne vrijednosti parametara koji pokazuju efikasnost početnica. Efikasnost početnica analizira se u programu Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad) tako da se promatra nekoliko parametara (Slika 3.4 A-B): nagib krivulje (eng. *slope*) iz kojeg se računa efikasnost same reakcije, vrijednost  $R^2$  koja govori o koeficijentu korelacije na temelju standardne krivulje dobivene od serijskih razrjeđenja te krivulja mekšanja. Ako svi analizirani parametri izgledaju dobro, dobiveni PCR produkt provjeri se elektroforezom na agaroznom gelu kako bi bili sigurni da je produkt prave veličine i da nije došlo do umnožavanja nespecifičnih produkata.



**Slika 3.4.** Analiziranje parametara bitnih za uhadavanje početnica za qPCR u programu Bio-Rad CFX Manager. A) Izgled standardne krivulje dobivene na temelju serijskih razrjeđenja cDNA. Distribucija točaka pravilna je što se odražava na vrijednosti nagiba i  $R^2$ . B) Primjer krivulje mekšanja analiziranog PCR produkta. Krivulja ima oblik jedinstvenog vrha bez popratnih vrhova koje mogu upućivati na nespecifične produkte. C) Provjera veličine i specifičnosti PCR produkta gena *SPRY2* za dvije reakcijske smjese (1:1-nerazrijeđeni uzorak i 1:3125) elektroforezom na agaroznom gelu.

### 3.3.6 Provjera DNA na agaroznom gelu

Veličina i kvaliteta dobivenih PCR produkata nakon reakcije qPCR-a može se provjeriti elektroforezom u 1 % (w/v) agaroznom gelu. Elektroforeza se odvija 20–25 minuta na konstantnih 100 V. Vrpce na gelu detektiraju se na instrumentu ImageMaster (UVITEC Cambridge, UK). Usporedbom s DNA markerom GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific) provjeri se ispravnost veličine dobivenog PCR produkta te je li došlo do umnožavanja nespecifičnih produkata tijekom PCR reakcije (Slika 3.4 C).

## 3.4 Analiza ekspresije proteina

### 3.4.1 Izdvajanje proteina iz stanica

Kako bi se iz stanica izdvojili proteini, stanice se trebaju sakupiti struganjem na ledu kako bi se očuvao integritet proteina. Proteini iz stanica izdvajaju se koristeći pufer za lizu koji je sačinjen od pufera RIPA (25 mM Tris-HCl, 1 % Na-deoksiholat, 1 % Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS) i inhibitora proteaza koji se dodaju u obliku tablete (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basel, Švicarska). Za analizu fosforiliranih oblika

proteina, uz inhibitore proteaza dodani su i inhibitori fosfataza PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor Cocktail, Roche) kako bi se spriječilo uklanjanje fosfatnih skupina. Na dobiveni talog stanica doda se 50  $\mu$ l pufera te se uzorci potom soniciraju dva puta na ledu po 15 sekundi pomoću sonikatora Labsonic M (Sartorius, Göttingen, Njemačka). Nakon sonikacije uzorci se centrifugiraju 20 minuta na 16000 x g u centrifugi ohlađenoj na +4 °C, supernatant s izdvojenim proteinima prebaci u čistu mikroeprevetu te pohrani u hladnjak na -80 °C do korištenja.

### 3.4.2 Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određuje se pomoću kolorimetrijske metode BCA, uz pomoć komercijalne otopine Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific) u pločicama s 96 bunarića. Prvi korak priprema je serijskih razrjeđenja poznatog standardnog proteina, 1 mg/ml BSA (goveđi albumin iz seruma) u sljedećim koncentracijama: 2000  $\mu$ g/ml, 1500  $\mu$ g/ml, 1000  $\mu$ g/ml, 750  $\mu$ g/ml, 500  $\mu$ g/ml, 250  $\mu$ g/ml, 125  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml te 0  $\mu$ g/ml. Napravi se radna otopina reagensa koja se sastoji od otopine A i otopine B u omjeru 50 : 1 koje se nanosi 200  $\mu$ l po bunariću. U bunariće s reagensom doda se 25  $\mu$ l proteina koji su razrijeđeni 10 x u vodi i standardi redom. Pločica se inkubira 30 minuta pri 37 °C u inkubatoru zaštićena od svjetla te potom očita apsorbancija na 562 nm spektrofotometru Labsystems Multiskan MS (Thermo Fischer Scientific).

### 3.4.3 Detekcija proteina westernskom metodom otiska

Westernska metoda otiska korištena je za analizu ekspresije proteina prilikom karakterizacije uspostavljenih rezistentnih staničnih linija. Prvi korak u westernskoj metodi otiska je razdvajanje proteina na SDS-poliakrilamidnom gelu. Za razdvajanje proteina koristi se 7 %-tni, a za sabijanje proteina 5 %-tni poliakrilamidni gel. 50  $\mu$ g proteina pripremi se s  $\frac{1}{4}$  konačnog volumena 4 x pufera za nanošenje (pufer LB sastava: 0,2 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 M DTT, 8 % SDS, 40 % glicerol, 0,001 % bromfenol blue) te denaturira 10 minuta pri 95 °C u termobloku. Elektroforeza se odvija u sustavu Mini-Protean III (Bio-Rad) prvih 10 minuta na konstantnih 90 V, a potom 1,5 h na 110 V. Proteinski marker CozyHi Prestained Protein Ladder (Bio-Rad) koristi se za kasnije određivanje veličine proteina. Nakon elektroforeze, proteini se prenose (eng. *transfer*) na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2  $\mu$ m (Protran, GE Healthcare, Chicago, Illinois, SAD) u sistemu za prijenos Mini-Protean III (Bio-Rad). Za proteine manje molekulske mase (do 50 kDa) uvjeti prijenosa su konstantna jakost struje od 200 mA tijekom 1 sata, a za proteine veće molekulske mase (veći od 50 kDa) konstantnih 100 V u periodu od 90 minuta. Nakon prijenosa, membrana se boja bojom Naphtol Blue (10 % metanol, 2 % octena kiselina, 0,1 % Naphtol Blue) kako bi se vizualizirali proteini. Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela, membrana se blokira u 5 % (w/v) otopini mlijeka u prahu u puferu TBST 1 sat pri sobnoj temperaturi na tresilici. Nakon blokiranja, na membrane se

dodaju otopine primarnih protutijela pripremljenih u 5 %-tnom mlijeku u TBST te inkubiraju preko noći pri 4°C. Korištena protutijela i njihova razrjeđenja prikazana su u Tablici 3.8. Kao kontrola količina nanesenih proteina koristi se  $\beta$ -aktin. Sljedeći dan dodaju se sekundarna protutijela odgovarajućih razrjeđenja u 5 %-tnoj otopini mlijeka u TBST (prema Tablici 3.8). Membrane se inkubiraju u otopini sekundarnih protutijela sat vremena pri sobnoj temperaturi. Za detekciju signala koristi se kombinacija kemiluminiscentnih reagensa SuperSignal West PICO i SuperSignal West FEMTO (oboje Thermo Fischer Scientific) koja se priprema u omjeru PICO:FEMTO 3:1. Membrane se slikaju u aparatu UVITEC Alliance Q9 Mini (UVITEC).

**Tablica 3.8.** Protutijela korištena za detekciju westernskom metodom otiska.

PRIMARNO PROTUTUJELO	RAZRJEĐENJE	SEKUNDARNO PROTUTUJELO	RAZRJEĐENJE
zečje protu-GLI1 IgG (Novus Biologicals, NB600-600)	1:500	HRP kozje protu-zečji IgG (BD Pharmingen, 554021)	1:6000
zečje protu-GLI3 IgG (GeneTex, GTX104362)	1:1000		
zečje protu-PCTH1 IgG (AB clonal, A0826)	1:1000		
zečje protu-GSK3 $\beta$ IgG (Cell Signaling Technologies, 9832S)	1:1000		
zečje protu-pGSK3 $\beta$ IgG (Cell Signaling Technologies, 5558P)	1:1000		
zečje protu-E kadherin IgG (Cell signaling Technologies, 3195S)	1:1000		
zečje protu-Vimentin IgG (Cell signaling Technologies, 5741S)	1:1000		
zečje protu-ERK IgG (Cell signaling Technologies, 4695S)	1:1000		
zečje protu-pERK IgG (Cell signaling Technologies, 4370s)	1:1000		
zečje protu-JNK IgG (Cell signaling Technologies, 9252S)	1:1000		
zečje protu-pJNK IgG (Cell signaling Technologies, 4668S)	1:1000		
zečje protu-p38 IgG (Cell signaling Technologies, 8690S)	1:1000		
zečje protu-pp38 IgG (Cell signaling Technologies, 4511S)	1:1000		
zečje protu-RAB34 IgG (ProteinTech, 27435-I-AP)	1:500		
zečje protu-p62 IgG (Cell signaling Technologies, 5114S)	1:1000		
zečje protu-LC3B IgG (Cell signaling Technologies, 2775S)	1:1000		
zečje protu-SHH IgG (Cell signaling Technologies, 2207S)	1:250		
zečje protu-SUFU IgG (Cell signaling Technologies, 2522S)	1:1000		
mišje protu-GLI2 IgG (Santa Cruz, sc-271786)	1:200	HRP kozje protu-mišji IgG (BD Pharmingen, 554002)	1:8000
mišje protu-SMO IgG (Santa Cruz, sc-13943)	1:200		
mišje protu- $\beta$ actin IgG (Cell Signaling Technologies, 3700S)	1:5000		
mišje protu-alfa tubulin (Zymed, 32-2700)	1:1000		

### 3.5 Analiza autofagije

U svrhu analize autofagije, praćena je ekspresija proteina p62 i LC3B koji služe kao biljezi tog procesa. Stanice se nasade u pločice sa 6 bunarića tako da u svakom bunariću bude  $5 \times 10^5$  stanica te 24 sata nakon tretiraju različitim kemijskim spojevima koji modificiraju proces autofagije. U sklopu ove disertacije korištena su četiri uvjeta, odnosno tretmana: (1) tretman 100 nM bafilomicinom A1 (inhibitor autofagije, Tocris Bioscience, Bristol, UK), (2) tretman 0,5  $\mu\text{M}$  rapamicinom (aktivator autofagije, Sigma Aldrich), (3) kombinirani tretman rapamicinom i bafilomicinom A1, te (4) netretirana kontrola. U tretmanu bafilomicinom stanice se inkubiraju 4 sata, dok tretman rapamicinom traje 48 sata. Za kombinirani tretman stanice se prvo tretiraju 0,5  $\mu\text{M}$  rapamicinom u trajanju tretmana od 44 sata te se potom posljednja 4 sata doda tretman 100 nM bafilomicinom A1. Po završetku tretmana, stanice se sakupe struganjem i ekspresija proteina analizira westernskom metodom otiska kao što je prethodno opisano.

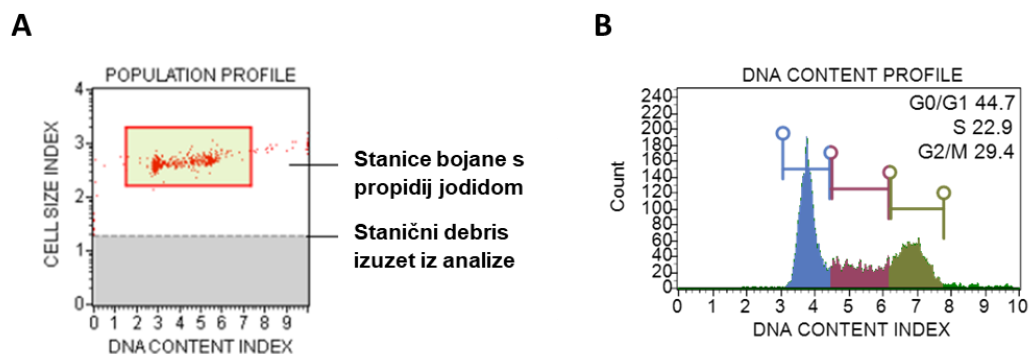
### 3.6 Protočna citometrija

U sklopu ovog doktorskog rada, protočna citometrija rađena je za karakterizaciju uspostavljenih rezistentnih staničnih linija. Analize se rade na stolnom protočnom citometru Guava Muse Cell Analyzer (Luminex, Austin, Texas, SAD) uporabom komercijalno dostupnih kompleta.

#### 3.6.1 Analiza staničnog ciklusa

Analiza staničnog ciklusa radi se koristeći komercijalno dostupni komplet Muse® Cell Cycle Kit (Luminex). Stanice se nasade u pločice sa šest bunarića tako da broj stanica u svakom bunariću bude  $2 \times 10^5$ . Dvadeset četiri sata nakon nasađivanja, stanice se tretiraju kemijskim spojem 10  $\mu\text{M}$  i 20  $\mu\text{M}$  GANT61 te 100 nM doksorubicinom (pozitivna kontrola za blokadu staničnog ciklusa u fazama G2/M), sakupe tripsiniziranjem (uključujući medij u kojem su stanice rasle te PBS s kojim su se stanice isprale) te centrifugiraju 5 minuta na 300 x g pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog stanica resuspendira se u 1 ml PBS te ponovo centrifugira kako bi se dodatno pročistio. Talog se resuspendira u 50  $\mu\text{L}$  PBS-a te suspenzija doda kap po kap u sterilne epruvete s ledeno hladnim 70%-tnim etanolom na ledu kako bi se stanice fiksirale. Epruvete se pritom vorteksiraju kako bi se razbili eventualni agregati stanica prilikom fiksacije te potom pohrane preko noći u hladnjak pri  $-20^\circ\text{C}$ . Na dan analize, fiksirane stanice prebace se u mikroeprevete od 1,5 ml te centrifugiraju 5 minuta na 300 x g na sobnoj temperaturi. Talog se resuspendira u 500  $\mu\text{L}$  PBS-a te ponovo pročisti, potom resuspendira u 200  $\mu\text{L}$  reagensa Muse Cell Cycle i inkubira 30 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorak se dobro resuspendira te očita u tri navrata na instrumentu. Prije samog očitavanja, potrebno je kalibrirati parametre instrumenta pomoću kojih se iz analize izuzmu mrtve stanice te fragmenti raspadnutih stanica (eng. *debris*) i namještaju granice markera kojima će

se jasno izdvojiti stanične populacije u različitim fazama staničnog ciklusa (Slika 3.5). Nakon očitavanja, rezultati se analiziraju pomoću programa Muse 1.5 Analysis (Luminex).

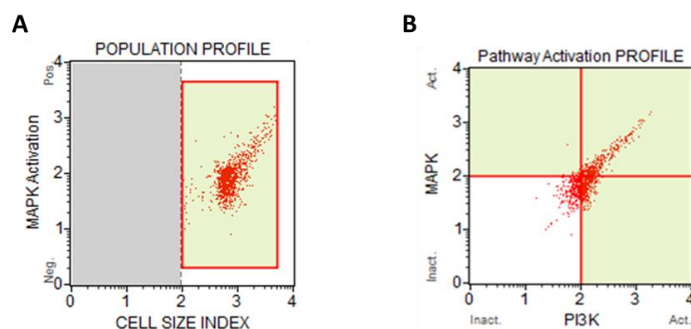


**Slika 3.5.** Kalibracija parametara za analizu staničnog ciklusa. A) Eliminacija staničnih fragmenata prema veličini čestica. B) Namještanje markera za svaku fazu staničnog ciklusa tako da se detektira jasan vrh (plavo – stanice u fazama G0/G1, ljubičasto – stanice u fazi S, zeleno – stanice u fazama G2/M) (preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.luminexcorp.com/muse-cell-cycle-kit/#overview>).

### 3.6.2 Analiza aktivnosti signalnih puteva PI3K/MAPK

Analiza aktivnosti signalnih puteva PI3K/MAPK radi se koristeći komercijalno dostupni komplet Muse® PI3K/MAPK Dual Pathway Activation Kit (Luminex). Stanice se nasade u pločice sa 6 bunarića tako se u svakom bunariću nalazi  $2 \times 10^5$  stanica te sljedeći dan tretiraju u trajanju od 30 minuta sa spojevima: 0,01 mM U0126 (Cell Signaling Technologies), GANT61 (Selleck Chemicals) u dvije doze 15  $\mu$ M i 25  $\mu$ M, arsenov trioksid (Sigma Aldrich) u dvije doze, 5  $\mu$ M i 15  $\mu$ M, 20 mM litijev klorid te 1  $\mu$ g/ml ciklopamin (Selleck Chemicals). Stanice se sakupe tripsiniziranjem te centrifugiraju 5 minuta na 300 x g pri sobnoj temperaturi, nakon čega se talozi resuspendiraju u 500  $\mu$ L PBS-a te dodatno pročiste. Dobiveni talozi resuspendiraju se u 100  $\mu$ L 1 x ASSAY BUFFER i jednakom volumenu pufera za fiksaciju stanica (oba dostupna iz kompleta) te potom inkubiraju 10 minuta na ledu. Nakon inkubacije uzorci se centrifugiraju, talozi resuspendiraju u 200  $\mu$ L ledeno hladnog pufera za permeabilizaciju (dostupan iz kompleta) te ponovo inkubiraju na ledu 10 minuta. Nakon inkubacije, talozi se sakupe ponovnim centrifugiranjem te pohrane u hladnjak pri  $-20^{\circ}\text{C}$  preko noći. Sutradan, talog se resuspendira u 180  $\mu$ L otopine pufera 1 x ASSAY BUFFER i 10  $\mu$ L mješavine protutijela (5  $\mu$ L anti-fosfo-Akt i 5  $\mu$ L anti-fosfo-ERK1/2, oba dostupna iz kompleta). Uzorci se inkubiraju 1 sat pri sobnoj temperaturi na rotirajućoj miješalici zaštićeni od svjetla. Nakon inkubacije, po uzorku doda se 100  $\mu$ L otopine pufera 1 x ASSAY BUFFER te se talozi sakupe centrifugiranjem. Talog se u konačnici resuspendira u 200  $\mu$ L otopine pufera 1 x ASSAY BUFFER te očitava u tri navrata na uređaju. Prije očitavanja, kao i u prethodnom poglavlju, potrebno je kalibrirati

parametre uređaja kojima će se iz analize eliminirati stanični fragmenti i jasno postaviti granice između različitih populacija stanica (Slika 3.6). Nakon očitavanja, rezultati se analiziraju pomoću programa Muse 1.5 Analysis (Luminex).



**Slika 3.6.** Kalibracija parametara za analizu aktivnost signalnih puteva PI3K/MAPK. A) Eliminacija staničnih fragmenata prema veličini čestica. B) Namještanje granica napravljeno je prema uputama dr. Jasek-Gajda (prema publikaciji (237) i osobnoj komunikaciji s autoricom) kako bi se jasno izdvojile različite populacije stanice (donji lijevi kvadrant – stanice s neaktivnim PI3K/MAPK, donji desni kvadrant – stanice s aktivnim PI3K, gornji desni kvadrant – stanice s aktivnim PI3K/MAPK, gornji lijevi kvadrant – stanice s aktivnim MAPK) (preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.luminexcorp.com/muse-cell-cycle-kit/#overview>).

### 3.7 Imunofluorescentno bojanje stanica

Imunofluorescentno bojanje koristilo se za vizualizaciju proteina bitnih za regulaciju primarnih cilija. Stanice se nasade u pločice s 24 bunarića te mikroskopska stakalca s 8 komorica tako da u svakom bunariću, odnosno komorici bude  $4 \times 10^4$  stanica. Dvadeset četiri sata nakon nasadivanja, stanicama se doda medij bez seruma te  $2,5 \mu\text{M}$  SAG kako bi se induciralo formiranje primarnih cilija. Stanice se inkubiraju u tretmanu 72 sata te potom fiksiraju u  $300 \mu\text{L}$   $3,6 \%$  paraformaldehida 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije, stanice se permeabiliziraju dodavanjem  $300 \mu\text{L}$   $0,5 \%$  Triton X-100 u PBS-u 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Po završetku permeabilizacije, stanice se inkubiraju 30 minuta pri sobnoj temperaturi u  $300 \mu\text{L}$  prethodno zagrijanog vrućeg citratnog pufera Epitope Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Glostrup, Danska). Nespecifično vezanje protutijela sprječava se inkubiranjem u otopini Protein Block (Dako) 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Primarna i sekundarna protutijela pripreme se razrijeđena 1:100 u  $2 \%$  BSA (goveđi albumin iz seruma eng. *Bovine Serum Albumin*) u PBS-u. Primarna protutijela se inkubiraju pri  $+4^\circ\text{C}$  preko noći, a sekundarna protutijela 1 sat pri sobnoj temperaturi u mraku. U slučaju stakalca, komorice se uklapaju u mediju koji sadrži DAPI (eng. *4',6-Diamidino-2-phenylindole*) (Invitrogen), dok kod pločica bojanje s DAPI predstavlja zasebni korak. Protutijela korištena za imunofluorescentno bojanje navedena su u Tablici 3.9.

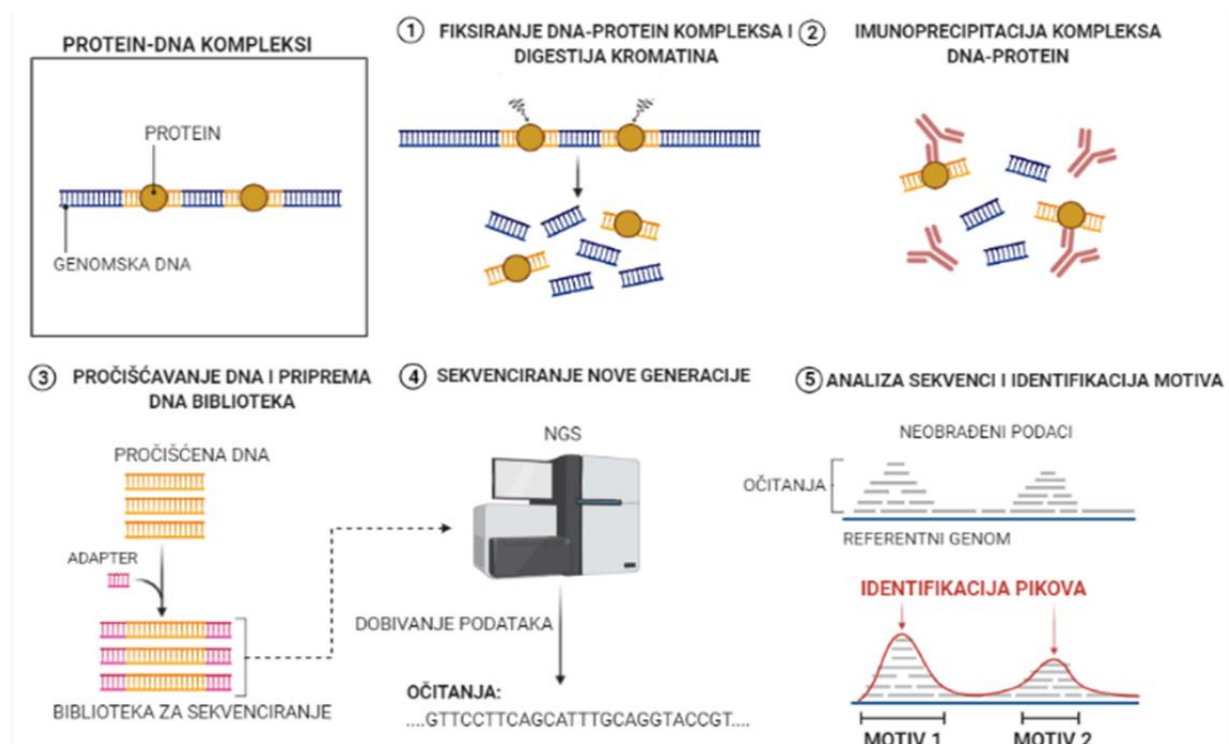


**Tablica 3.9.** Protutijela korištena za imunofluorescentno bojanje. Sekundarna antitijela su konjugirana s fluorescentnim bojama Alexa Fluor 594 ili Alexa Fluor 488.

<b>PRIMARNO PROTUTIJELO</b>	<b>RAZRJEĐENJE</b>	<b>SEKUNDARNO PROTUTIJELO</b>	<b>RAZRJEĐENJE</b>
mišje protu-alfa tubulin (Zymed, 32-2700)	1:100	protu-mišje IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor 594 Conjugate), Cell Signaling Technologies, 8890	1:100
zečje protu-RAB34 IgG (ProteinTech, 27435-I-AP)	1:100	protu-zečje IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate), Cell Signaling Technologies, 4412	1:100

### 3.8 Nativna kromatinska imunoprecipitacija uz sekvenciranje

Nativna kromatinska imunoprecipitacija uz sekvenciranje (eng. *Chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq*) metoda je koja omogućava proučavanje interakcije DNA i proteina, u slučaju ovog doktorskog rada identifikaciju potencijalnih transkripcijskih meta proteina GLI1, GLI2 i GLI3. Metoda se svodi na nekoliko koraka: početna fiksacija interakcija DNA i proteina, cijepanje DNA na fragmente manje veličine te izdvajanje fragmenata od interesa uporabom specifičnih protutijela. Kasnije, od dobivenih kromatinskih fragmenata se pripremaju biblioteke za sekvenciranje nove generacije (Slika 3.7).



**Slika 3.7.** Protokol native imunoprecipitacije uz sekvenciranje. U stanicama, transkripcijski faktori se vežu za promotore svoji ciljnih gena. 1) Fiksiranje uspostavljenih interakcija proteina i DNA, nakon čega se DNA cijepa u fragmente manje veličine. 2) Uporabom specifičnih protutijela, imunoprecipitiraju se kompleksi DNA i proteina od interesa. 3) DNA se pročišćava te koristi za pripremu biblioteka. 4) Pripremljene biblioteke idu na sekvenciranje nove generacije. 5) Dobiveni podaci se bioinformatički analiziraju (shema izrađena pomoću platforme BioRender <https://app.biorender.com>).

### 3.8.1 Validacija protutijela

U sklopu ovog doktorskog rada, imunoprecipitacija se koristila kako bi se protutijela za nativnu kromatinsku imunoprecipitaciju uz sekvenciranje validirala, odnosno da bi se provjerilo je li protutijelo specifično, odnosno povlači li protein od interesa. U tu svrhu, stanice se nasade u petrijevke promjera 10 cm te 24 sata nakon nasađivanja talog stanica sakupi struganjem na ledu kao što je prethodno opisano. Za potrebe imunoprecipitacije, dobiveni talog resuspendira se u 150  $\mu$ l pufera za lizu TENN (50 mM Tris pH 7,4, 5 M EDTA, 150 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Nonidet P-40, inhibitori proteaza). Ostali koraci izdvajanja proteina jednaki su onima prethodno opisanim. U reakciju imunoprecipitacije ide se s 1000  $\mu$ g proteina, s tim da se od svakog uzorka izdvoji 50  $\mu$ g proteina za analizu ukupnih proteina stavljenih u reakciju imunoprecipitacije (tzv. kontrola INPUT).

Kako bi se izdvojili proteini od interesa, koriste se magnetne kuglice Dynabeads obložene proteinom G (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD) te magnetski stalak DynaMag (Life Technologies). Po uzorku se koristi 50  $\mu$ l otopine magnetnih kuglica. Mikroeprovete se postavljaju na magnet kako bi se kuglice izdvojile iz otopine. Supernatant se ukloni, a kuglice isperu u 200  $\mu$ l pufera WASH & BIND (0,1 M natrij fosfat, 0,01 % (v/v) Tween20 pH 9,0) te potom inkubiraju na rotirajućoj miješalici 20 minuta pri sobnoj temperaturi u otopini prethodno pripremljenih protutijela u puferu WASH & BIND. Za imunoprecipitaciju proteina GLI1 korišteno je 10  $\mu$ g protutijela GLI1 (AF3324, R&D SYSTEMS, Minneapolis, Minnesota, SAD), za protein GLI2 4  $\mu$ g protutijela GLI2 (AF3526, R&D SYSTEMS), te za protein GLI3 10  $\mu$ g protutijela GLI3 (AF3690, R&D SYSTEMS) po uzorku. Za svaki uzorak također se radi i negativna kontrola koju predstavljaju same magnetne kuglice bez dodanog protutijela. Nakon inkubacije, mikroeprovete se stavljaju na magnet te supernatant ukloni. Magnetne kuglice koje su vezale protutijelo se 3 puta ispiru u 200  $\mu$ l pufera TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween20 pH 7,5). Nakon zadnjeg ispiranja, magnetne kuglice se pomiješaju s prethodno pripremljenih 1000  $\mu$ g proteina te inkubiraju na rotirajućoj miješalici u hladnoj komori pri +4°C preko noći. Tijekom inkubacije, magnetne kuglice s vezanim protutijelom vezat će se za protein od interesa. Sutradan, magnetne kuglice se ispiru 3 puta u 200  $\mu$ l pufera TBST. Nakon zadnjeg ispiranja, prije same elucije, kuglice se resuspendiraju u 100  $\mu$ l pufera TBST te prebace u novu mikroeprovetu od 1,5 ml kako se ne bi eluirali proteini nespecifično vezani za stijenke korištene mikroeprovete. Nova mikroeproveta se stavi u magnetni stalak te supernatant ukloni, nakon čega se doda 20  $\mu$ l 1 x pufera LB (0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 M DTT, 2 % SDS, 10 % glicerol, 0,00025 % bromfenol plavo) te se uzorci zagriju 10 minuta pri 70°C u termobloku kako bi se eluirali vezani proteini. Nakon elucije, mikroeproveta se ponovo stavi na magnetni stalak kako bi izdvojili prazne magnetne kuglice i supernatant u kojem se nalaze proteini. Supernatant se prenese u čistu mikropipetu te je

spreman za analizu westernskom analizom otiska kao što je prethodno opisano. Uz imunoprecipitirane uzorke, analizira se i negativna kontrola te prethodno pripremljeni uzorci ukupnih proteina koji služe kao kontrola da se u početnom uzorku zaista nalazio protein koji pokušavamo detektirati. Westernskom analizom otiska detektira se ciljani protein korištenog protutijela. Protutijela korištena za detekciju westernskom analizom otiska navedena su prethodno u Tablici 3.9.

### 3.8.2 Fiksacija stanica i digestija kromatina

Prvi korak u CHIP-seq fiksacija je uspostavljenih interakcija između DNA i proteina. U tu svrhu, odabrane stanične linije A375, MEL224 i CHL-1 nasade se u boce 175-T za uzgoj tako da je u svakoj boci za uzgoj  $4 \times 10^6$  stanica. Fiksacija stanica i kromatinska digestija rade se uz pomoć kompleta SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP kit (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts SAD). Dvadeset četiri sata nakon nasađivanja, stanice se fiksiraju u dva koraka, prvo koristeći 2 mM DSG (Di(N-sucinimidil) glutarat) (Merck KGaA) u PBS-u 30 minuta, te potom u 1 % formaldehidu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Fiksacija stanica blokira se dodatkom 10x otopine glicina (dostupno iz kompleta) 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Stanice se potom isperu dva puta u ledeno hladnom PBS te im se doda otopina 200 x PIC-PBS (*Protease Inhibitor Cocktail*, dostupno iz kompleta) nakon čega se sakupe struganjem. Talog stanica dobije se centrifugiranjem 5 minuta na 2000 x g u centrifugi ohlađenoj pri +4°C.

Nakon što se fiksiraju uspostavljene interakcije DNA i proteina, potrebno je DNA pocijepati u manje fragmente kromatina u rasponu veličina 100 – 900 pb. Za nastavak rada pripreme se puferi: PUFER A 1 x (250 µl PUFER A 4 x, 750 µl voda, 0,5 µl 1 M DTT, 5 µl 200 x PIC), PUFER B 1 x (275 µl PUFER B 1 x, 825 µl VODA, 0,55 µl 1 M DTT) te PUFER CHIP 1 x (10 µl PUFER CHIP 10 x, 90 µl voda, 0,5 µl 200 x PIC). Talog stanica resuspendira se u pripremljenom hladnom 1 x PUFERU A te inkubira na ledu 10 minuta. Tijekom inkubacije stanice se miješaju izvrtanjem tubice svake 3 minute nakon čega se talog sakupi centrifugiranjem 5 minuta na 2000 x g u centrifugi ohlađenoj pri + 4°C. Talog se resuspendira u hladnom 1 x PUFERU B te sakupi ponovnim centrifugiranjem 5 minuta na 2000 x g u centrifugi ohlađenoj pri +4°C. Sakupljeni talog se još jednom resuspendira u 1 x PUFERU B nakon čega se doda 2 µl enzima, mikrokokalne nukleaze (dostupno iz kompleta). Uzorak se promiješa nekoliko puta izvrtanjem tubice te inkubira 20 minuta pri 37°C na termobloku uz miješanje. Tijekom inkubacije uzorak se dodatno miješa izvrtanjem tubice svake 3 minute. Digestija kromatina blokira se dodatkom 0.5 M EDTA na ledu 2 minute. Otopina se centrifugira na 16000 x g 1 minutu u centrifugi ohlađenoj pri +4°C, sakupljeni talog resuspendira u 1 x PUFERU CHIP te inkubira na ledu 10 minuta. Nakon inkubacije, lizat se sonicira na ledu u 2

navrata po 15 sekundi uz pauzu za hlađenje od 30 sekundi između 2 pulsa. Nečistoće se uklone centrifugiranjem na 9400 x g 10 minuta u centrifugi ohlađenoj pri +4°C te supernatanti pohrane u hladnjaku na -80°C do nastavka pokusa.

### 3.8.3 Imunoprecipitacija kromatina

Za jednu reakciju imunoprecipitacije koristi se 5-10 µg dobivenog kromatina što odgovara potrebnom broju nasadenih stanica od  $4 \times 10^6$ . Pripremljeni lizati otope se na ledu te svježe pripreme potrebni puferi. Sastav pufera je sljedeći: pufer LOW SALT WASH (300 µl 10 x PUFER CHIP, 2,7 ml voda), pufer HIGH SALT WASH (100 µl 10 x PUFER CHIP, 900 µl voda, 70 µl 5 M NaCl), pufer 1 x CHIP (40 µl 10 x PUFER CHIP, 360 µl voda, 2 µl 200 x PIC). Uzorak kromatina razrijedi se četiri puta u 1 x PUFERU CHIP. Od razrijeđenja, 10 µl prebaci se u čistu mikroeprevetu te spremi u hladnjak na -20°C do upotrebe (kontrola INPUT). Ostatak uzorka raspodijeli se po 500 µl u čiste mikroeprevete te se doda protutijelo specifično za protein od interesa. Korištena protutijela prikazana su Tablici 3.10. Uzorci se inkubiraju u protutijelima preko noći pri 4°C na rotirajućoj miješalici. Za svaki uzorak, uključujući kontrolu INPUT pripremi se 1 x CHIP ELUTION (75 µl PUFER 2 x CHIP ELUTION + 75 µl voda). Na svaki uzorak doda se 30 µl kuglica te se uzorci inkubiraju na rotirajućoj miješalici 2 sata pri +4°C. Nakon inkubacije, uzorci se stave na magnetni stalak 2 minute te se ukloni supernatant. Kuglice vezane za magnet isperu se u puferu LOW SALT WASH te inkubiraju 5 minuta na rotirajućoj miješalici pri + 4°C. Postupak odvajanja kuglica i ispiranja ponovi se još 2 puta (ukupno 3 ispiranja). Na kuglice doda se pufer HIGH SALT WASH te se kuglice inkubiraju na rotirajućoj miješalici 5 minuta pri + 4°C.

**Tablica 3.10.** Popis protutijela korištenih za reakciju imunoprecipitacije kromatina.

PROTUTIJELO	KOLIČINA/UZORAK	PROIZVOĐAČ
ljusko protutijelo GLI1 Antigen Affinity-pročišćeni poliklonalni kozji IgG	10 µg	R&D SYSTEMS, kat.br AF3324
ljusko protutijelo GLI2 Antigen Affinity-pročišćeni poliklonalni ovčiji IgG	4 µg	R&D SYSTEMS, kat.br AF3526
ljusko/mišje protutijelo GLI3 Antigen Affinity- pročišćeni poliklonalni kozji IgG	10 µg	R&D SYSTEMS, kat.br AF3690
Histone H3 (D2B12) XP zečje monoklonalno protutijelo (formulirano za ChIP) *	10 µl	Cell Signaling Technology, kat br. 4620
normalni zečji IgG	1 µg	Cell Signaling Technology, kat br. 2729

\*podatak o koncentraciji protutijela nije dostupan kod proizvođača (korištena preporučena količina izražena isključivo u µl).

Nakon inkubacije, supernatant se ukloni na magnetnom stalku te se po uzorku (uključujući INPUT kontrolu) doda 150 µl pripremljenog pufera 1 x CHIP ELUTION. Uzorci sa specifičnim protutijelima inkubiraju se 30 minuta pri 65°C u termobloku uz miješanje. Kontrola INPUT inkubira se pri sobnoj temperaturi na radnom stalku. Nakon inkubacije, uzorci se stave na

magnetni stalak te se supernatanti pažljivo prebace u čiste mikroeprovete. Na uzorke imunoprecipitacije i kontrolu INPUT doda se 6  $\mu$ l 5 M NaCl i 2  $\mu$ l proteinaze K (dostupni iz kompleta) te se uzorci inkubiraju 2 sata pri 65°C u termobloku. Kromatinski fragmenti dodatno se pročiste na kolonama (dostupne iz kompleta) po uputama proizvođača. Na svaki uzorak doda se 750  $\mu$ l DNA Binding pufera te se uzorci kratko vorteksiraju. Od uzorka, 450  $\mu$ l prebaci se na kolonicu te potom centrifugira na 16000 x g 30 sekundi. Nakon centrifugiranja, tekućina iz mikroeprovete kolonice se ukloni. Preostalih 750  $\mu$ l uzorka prebaci se na kolonicu te ponovi korak centrifugiranja. Na uzorak se doda 750  $\mu$ l pufer DNA WASH, centrifugira na 16000 x g na 30 sekundi te potom ukloni tekućina sakupljena u mikroeproveti kolonice. Potom se na kolonicu doda 50  $\mu$ l pufer DNA ELUTION, te se kolonica prebaci u novu mikroeprovetu od 1,5 ml u koju će se sakupiti pročišćena DNA. Centrifugiranjem na 16000 x g 30 sekundi sakupi se pročišćena DNA koja se pohrani u hladnjaku pri -20°C do pripreme biblioteka.

### **3.8.4 Priprema biblioteka DNA za sekvenciranje nove generacije**

Priprema biblioteka predstavlja prvi korak kod sekvenciranja nove generacije. Priprema biblioteka DNA uključuje obradu kromatinskih krajeva, dodavanje adaptera i indeksiranih početnica, umnožavanje indeksiranih fragmenata te pročišćavanje uzorka.

Koncentracija DNA izmjeri se na fluorimetru Qubit V3 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD). Priprema biblioteka DNA radi se po uputama proizvođača kompleta SimpleChip ChIP-seq DNA Library Prep Kit for Illumina (Cell Signaling Technology). Za pripremu biblioteka koristi se 5 ng pročišćenog imunoprecipitiranog kromatina. Prvo se pripremi pufer 1 x TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Od uzorka kromatina, 5 ng (uključujući kontrolu INPUT) promiješa se s puferom 1 x TE do ukupnog volumena 50  $\mu$ l u mikroeproveta od 0,2 ml. Na svaki uzorak doda se 3  $\mu$ l mješavine End-prep enzyme i 7  $\mu$ l pufera End-prep reaction. Uzorci se stave u aparat za PCR 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) s postavljenim uvjetima reakcije: 30 minuta 20°C, 30 minuta 65°C, održavanje temperature na kraju reakcije na 4°C.

Adapteri se otope pri sobnoj temperaturi i razrijede u puferu 10 mM Tris-HCl pH 8,0 do radne koncentracije od 1,5  $\mu$ M. Na uzorke se doda 30  $\mu$ l mješavine Library-prep ligation, 1  $\mu$ l Ligation enhancer-a i 2,5  $\mu$ l radne otopine adaptera. Uzorci se dobro promiješaju pipetiranjem te inkubiraju 15 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, po uzorku doda se 3  $\mu$ l enzima USER te se uzorci inkubiraju 15 minuta pri 37°C u aparatu za PCR 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Uzorci se potom prebace u čiste mikroeprovete od 1,5 ml. Po uzorku se doda 87  $\mu$ l AMPure XP beads magnetnih kuglica (Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, SAD). Uzorci se potom stave na magnetni stalak te supernatanti pažljivo uklone nakon 5 minuta. Na uzorke se doda 200  $\mu$ l 80 %-tnog etanola bez doticanja kuglica te se nakon inkubacije od 30 sekundi etanol pažljivo ukloni. Ispiranje s 80 %-tnim etanolom ponovi se još

jednom na isti način. Uzorci se nakon toga osuše 5 minuta na magnetnom stalku kako bi sav etanol ishlapio pazeći da magnetne kuglice ne presuše. Elucija kromatinskih fragmenata s vezanim adapterima radi se resuspendiranjem magnetnih kuglica u 17  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 te inkubiranjem 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Uzorci se potom vrata na magnetni stalak te 15  $\mu$ l supernatanta prebaci u nove mikroeprovete od 0,2 ml. U svaki uzorak se doda 25  $\mu$ l mješavine Q5 PCR-master, 5  $\mu$ l početnice Dual-indeks 7 i 5  $\mu$ l početnice Dual-indeks 5. Svakom uzorku se doda jedinstvena kombinacija indeksiranih početnica kako bi znali koja očitavanja pripadaju kojem uzorku (Tablica 3.11). Uzorci se stave u aparat za PCR 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) na sljedeće uvjete:

98°C	30 sek	
98°C	10 sek	} 10 ciklusa
65°C	75 sek	
65°C	5:00 min	
4°C	$\infty$	

Nakon reakcije umnažanja, po uzorku se doda 45  $\mu$ l magnetnih kuglica AMPure XP beads (Beckman Coulter). Uzorci se potom stave na magnetni stalak te se supernatanti pažljivo uklone nakon 5 minuta. Na uzorke se doda 200  $\mu$ l 80 %-tnog etanola bez doticanja magnetnih kuglica te se pažljivo ukloni nakon 30 sekundi. Ispiranje etanolom ponovi se još jednom po istom principu. Uzorci se nakon toga suše 5 minuta na magnetnom stalku kako bi sav etanol ishlapio pazeći da magnetne kuglice ne presuše. Elucija umnoženih kromatinskih fragmenata s vezanim adapterima radi se resuspendiranjem magnetnih kuglica u 33  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 te inkubiranjem 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon elucije, uzorci se vrata na magnetni stalak te se 30  $\mu$ l supernatanta prebaci u nove mikroeprovete od 0,2 ml. Koncentracija uzoraka provjeri se na fluorimetru Qubit V3 (Invitrogen). Prije sekvenciranja nove generacije, kvaliteta biblioteka analizira se na uređaju Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Usluga sekvenciranja nove generacije provedena je u Laboratoriju za naprednu genomiku Instituta Ruđer Bošković na uređaju NextSeq 500 (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD).

**Tablica 3.11.** Indeksi korišteni prilikom pripreme biblioteka DNA, njihovi nukleotidni slijedovi te uzorci kojima su pridruženi.

		INDEX 700	SEKVENCA	INDEX 500	SEKVENCA
1	A375 INPUT	701	A T T A C T C G	501	T A T A G C C T
2	A375 GLI1	701	A T T A C T C G	502	A T A G A G G C
3	A375 GLI2	701	A T T A C T C G	503	C C T A T C C T
4	A375 GLI3	701	A T T A C T C G	504	G G C T C T G A
5	A375 PK H3	702	T C C G G A G A	501	T A T A G C C T
6	A375 GLI1	702	T C C G G A G A	502	A T A G A G G C
7	A375 GLI2	702	T C C G G A G A	503	C C T A T C C T
8	A375 GLI3	702	T C C G G A G A	504	G G C T C T G A
9	CHL-1 INPUT	703	C G C T C A T T	501	T A T A G C C T
10	CHL-1 GLI1	703	C G C T C A T T	502	A T A G A G G C
11	CHL-1 GLI2	703	C G C T C A T T	503	C C T A T C C T
12	CHL-1 GLI3	703	C G C T C A T T	504	G G C T C T G A
13	CHL-1 PK H3	704	G A G A T T C C	501	T A T A G C C T
14	CHL-1 GLI1	704	G A G A T T C C	502	A T A G A G G C
15	CHL-1 GLI2	704	G A G A T T C C	503	C C T A T C C T
16	CHL-1 GLI3	704	G A G A T T C C	504	G G C T C T G A
17	MEL224 INPUT	705	A T T C A G A A	501	T A T A G C C T
18	MEL224 GLI1	705	A T T C A G A A	502	A T A G A G G C
19	MEL224 GLI2	705	A T T C A G A A	503	C C T A T C C T
20	MEL224 GLI3	705	A T T C A G A A	504	G G C T C T G A
21	MEL224 PK H3	706	G A A T T C G T	501	T A T A G C C T
22	MEL224 GLI1	706	G A A T T C G T	502	A T A G A G G C
23	MEL224 GLI2	706	G A A T T C G T	503	C C T A T C C T
24	MEL224 GLI3	706	G A A T T C G T	504	G G C T C T G A

### 3.8.5 Bioinformatička analiza rezultata ChIP-seq

Bioinformatičku analizu podataka do sastavljanja liste potencijalnih transkripcijskih meta napravio je suradnik dr.sc. Nenad Bartoniček (Institut Garvan, Australija). Bibliotekama DNA uklone se adapteri koristeći program FastQC (v.0.11.5), nakon čega se mapiraju pomoću programa BWA (V.0.7.9a) na sekvencu genoma čovjeka (verzija hg38). Nakon što se uklone duplikati pomoću programskog alata Picard Tools (v.1.138), vrhovi se identificiraju programom MACS (V.2.0.10) koristeći parametre -f BAMPE -g -B -q 0.01. Ostale analize rade se u programu R (v.4.0.1) s programskim paketima ChIPpeakAnno i ChIPseeker koristeći vlastite prilagođene skripte koje su dostupne na <https://github.com/NenBarto/GLI>. Analiza motiva radi se pomoću programa MEME Suite v.5.3.0.

Nakon navedenih analiza na Institutu Garvan, dobivena lista potencijalnih transkripcijskih meta elektronički je poslana, nakon čega je analizirana na Institutu Ruđer Bošković uporabom nekoliko javno dostupnih alata. Uporabom platforme Gene Cards v.5.11 (<https://www.genecards.org/>) mogu se dobiti informacije o građi, funkciji te signalnim putevima



s kojima je povezan gen, odnosno protein. Gepia (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*, <http://gepia.cancer-pku.cn/>) je platforma na kojoj se može vidjeti ekspresija gena u različitim tkivima, krivulje preživljenja te usporedba ekspresije gena u zdravom u odnosu na tumorsko tkivo. String v.11.5 (<https://string-db.org/>) je platforma na kojoj se mogu proučavati interakcijske mreže proteina od interesa te same jačine istih. JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>) je platforma na kojoj se mogu analizirati profili veznih mjesta transkripcijskih faktora u genomu eukariota. U platformi JASPAR provjerena je prisutnost konsenzus sekvenci za proteine GLI u promotorima gena. Prilikom analize gena za daljnju selekciju, odabrani su geni povezani s malignim oboljenjima (primarno melanomom), signalnim putem RAS/RAF/MAPK te geni koji pokazuju promijenjenu ekspresiju od odnosa na zdravo tkivo kože. Također, genima u čijim promotorima su pronađena vezna mjesta za transkripcijske faktore GLI dana je posebna pozornost.

### **3.9 Statistička obrada podataka**

Za analizu podataka koji su pokazivali normalnu distribuciju korišteni su Studentov T-test (za usporedbu dva seta podataka) ili ANOVA (za usporedbu više od dva seta podataka). P vrijednosti niže od 0,05 smatrale su se statistički značajnima.

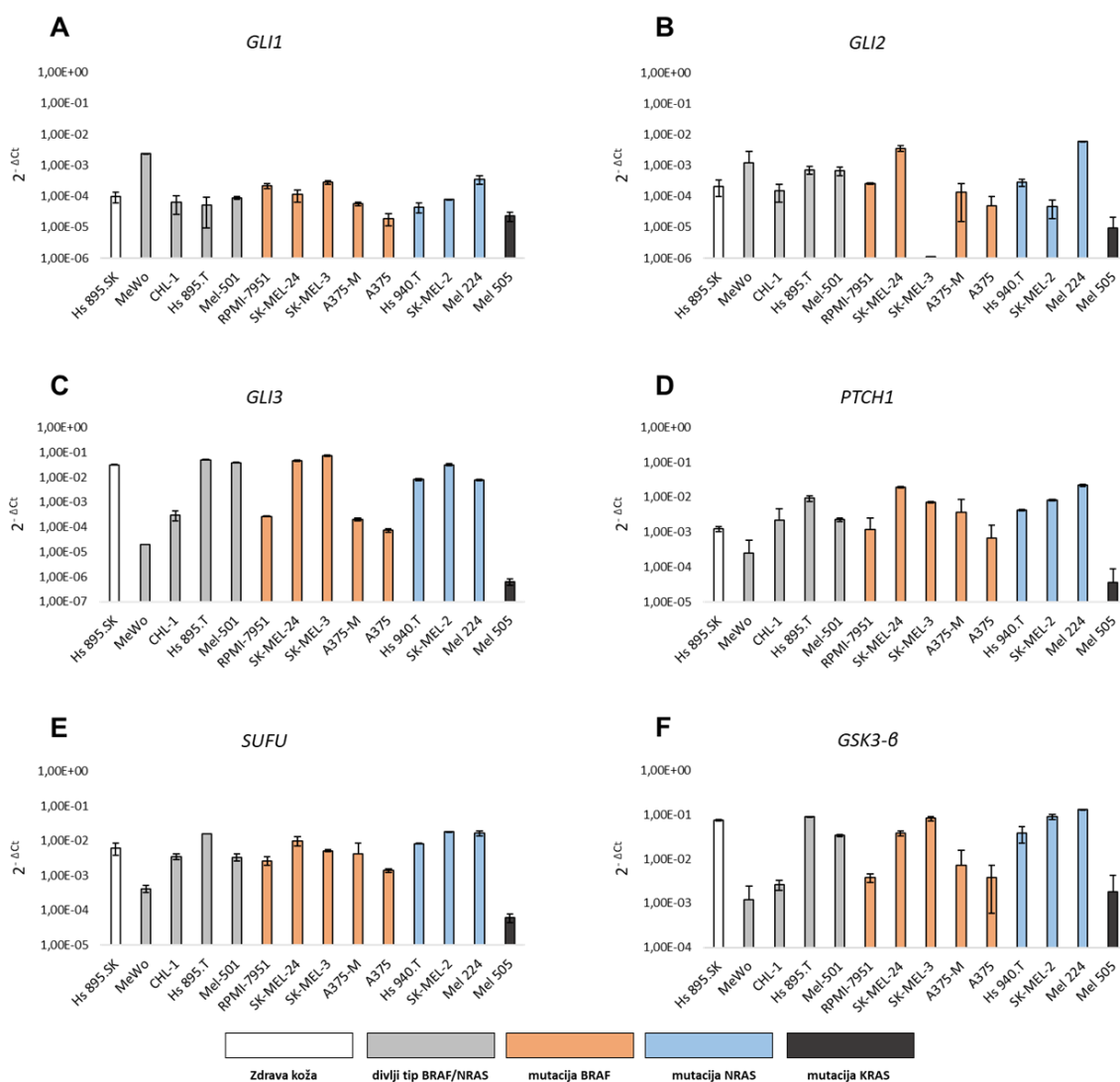
Za analizu vijabilnosti i migracijske sposobnosti, svi su eksperimenti rađeni u biološkim duplikatima te u tehničkim četriplicitima. Za analizu sposobnosti formiranja kolonija, eksperimenti su rađeni u biološkim duplikatima, te je izračunat koeficijent korelacije po Pearsonu ( $r$ ) koji pokazuje ovisnost vijabilnosti stanica o dozi spojeva. Koeficijent korelacije je broj između vrijednosti 0 i 1, pri čemu vrijednosti od 0,76 do 1 predstavljaju vrlo dobru do izvrsnu povezanost, od 0,51 do 0,75 umjerenu do dobru povezanost, dok vrijednosti ispod 0,5 predstavljaju slabu povezanost. Eksperimenti vezani uz protočnu citometriju (analiza staničnog ciklusa i aktivnosti signalnog puta RAS/RAF/MAPK) rađeni su u biološkim duplikatima i tehničkim triplikatima, te su za statistički značajne vrijednosti uzete vrijednosti koje se poklapaju u oba biološka duplikata te su značajne nakon Bonferronijeve korekcije. Gdje je bilo potrebno, sirovi podaci obrađeni su u programu Excel, a potom analizirani programom MedCalc for Windows verzija 19.4.1 (MedCalc Software, Belgija).

## 4. REZULTATI

## 4.1 Karakterizacija i odabir staničnih linija melanoma

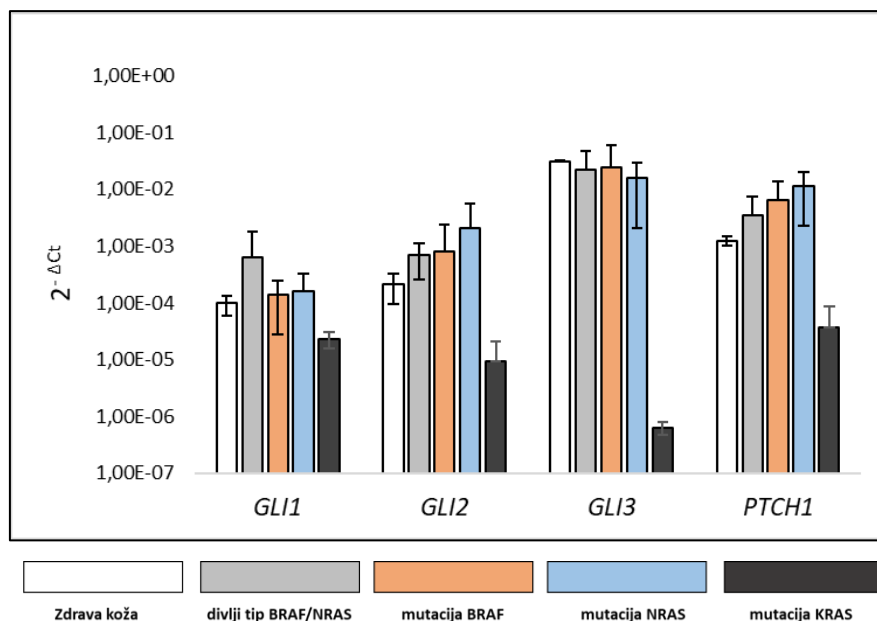
### 4.1.1 Genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI

Kvantitativnim real time PCR-om određena je genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI: *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1*, *SUFU* i *GSK3-β* na panelu od 13 staničnih linija melanoma: MeWo, CHL-1, Hs 895.T, Mel-501, RPMI-7951, SK-MEL-24, SK-MEL-3, A375-M, A375, Hs 940.T, SK-MEL-2, Mel 224, Mel 505 te kontrolne linije zdrave kože Hs 895.SK (Slika 4.1).



**Slika 4.1** Razine genske ekspresije komponenti signalnog puta HH-GLI, *GLI1* (A), *GLI2* (B), *GLI3* (C), *PTCH1* (D), *SUFU* (E) i *GSK3-β* (F) na panelu staničnih linija melanoma. Na apscisi su prikazane analizirane stanične linije, a na ordinati izražena relativna razina ekspresije normalizirana prema genu *RPLP0* u obliku vrijednosti  $2^{-\Delta Ct}$  (log10 skala). Bojama je označen mutacijski status staničnih linija za gene *BRAF*, *NRAS* i *KRAS*: bijelo (zdrava koža), sivo (divlji tip *BRAF/NRAS/KRAS*), narančasto (mutacija *BRAF*), plavo (mutacija *NRAS*), crno (mutacija *KRAS*).

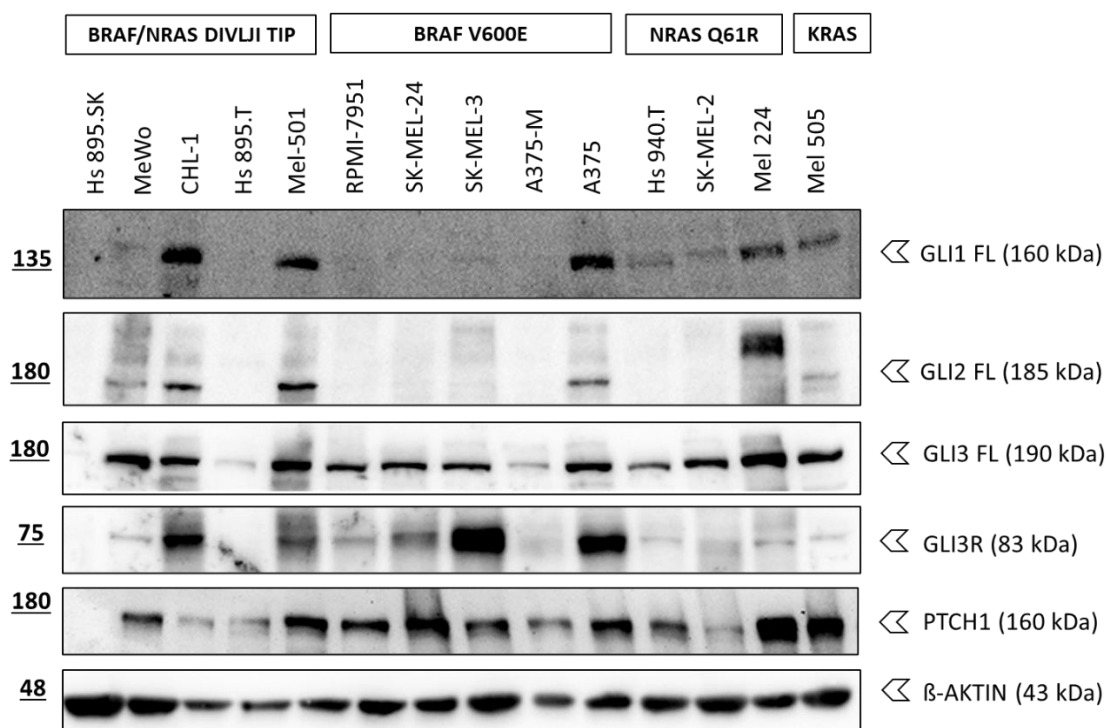
Za usporedbu razine ekspresije korištene su  $2^{-\Delta Ct}$  vrijednosti dobivene normalizacijom na referentni gen, *RPLP0*. Vidljivo je da sve stanične linije eksprimiraju komponente signalnog puta (uključujući zdravu kontrolu Hs 895.SK), no *KRAS* mutirana stanična linija, Mel 505 pokazuje najslabiju ekspresiju svih komponenata. Gledajući mutacijski status gena *BRAF* i *NRAS*, nema razlike u prosječnoj ekspresiji komponenata među staničnim linijama. *GLI3* pokazuje najjaču prosječnu ekspresiju među svim linijama (Slika 4.2.).



**Slika 4.2.** Prosječna razina genske ekspresije komponenti HH-GLI, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3* i *PTCH1* u staničnim linijama melanoma s obzirom na mutacijski status gena *BRAF*, *NRAS* i *KRAS*. Na apscisi su prikazani analizirani geni, a na ordinati izražena prosječna razina ekspresije u obliku vrijednosti  $2^{-\Delta Ct}$ . Bojama je označen mutacijski status staničnih linija za gene *BRAF*, *NRAS* i *KRAS*: bijelo (zdrava koža), sivo (divlji tip *BRAF/NRAS/KRAS*), narančasto (mutacija *BRAF*), plavo (mutacija *NRAS*), crno (mutacija *KRAS*).

#### 4.1.2 Ekspresija proteina signalnog puta HH-GLI

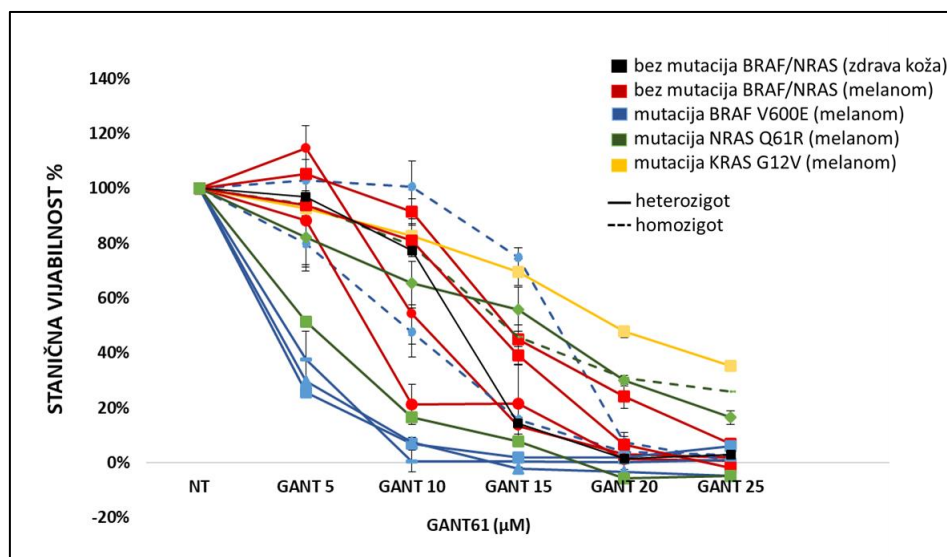
Westernskom analizom otiska ispitana je ekspresija proteina signalnog puta HH-GLI na panelu od 14 staničnih linija melanoma te uspoređena s rezultatima genske ekspresije. Za razliku od genske ekspresije koja je slična između staničnih linija, ekspresija proteina GLI1, GLI2, GLI3 i PTCH1 je raznolika. Proteine GLI1 i GLI2 stanične linije različito ekspimiraju, dok je ekspresija GLI3 dosta jaka i stabilna u svim linijama. Neke linije ekspimiraju čak i represorski oblik proteina GLI3 (GLI3R, veličine 83 kDa), dok se aktivatorski oblik pune duljine (GLI3FL, veličine 190 kDa) detektira u svim staničnim linijama melanoma. Iako ekspresija proteina GLI1, GLI2 i GLI3 varira, ekspresija proteina PTCH1, direktne transkripcijske mete HH-GLI dosta je stabilna u svim linijama. Zanimljivo, iako stanična linija Hs 895.SK koja predstavlja zdravu kontrolu (fibroblasti kože), ekspimirira sve komponente na razini gena, na razini proteina nije detektirana ni jedna komponenta (Slika 4.3). Analiza ekspresije proteina je osobito važna za metodu native imunoprecipitacije kromatina uz sekvenciranje jer se za navedenu metodu moraju odabrati stanične linije koje imaju najjaču ekspresiju proteina GLI. U svrhu navedene metode odabrane su tri stanične linije koje pokazuju najjaču ekspresiju proteina GLI1, GLI2 i GLI3: CHL-1 (divlji tip *BRAF/NRAS*), Mel 224 (*NRAS Q61R*) te A375 (*BRAF V600E*).



**Slika 4.3.** Ekspresija proteina GLI1, GLI2, GLI3 i PTCH1 na panelu staničnih linija melanoma.  $\beta$ -aktin služi kao kontrola nanošenja proteina. FL označava formu proteina pune duljine, a R represorsku formu proteina.

#### 4.1.3 Odgovor staničnih linija melanoma na inhibiciju HH-GLI

Kako bi se ispitaio odgovor staničnih linija melanoma na inhibiciju signalnog puta HH-GLI napravljen je test MTT koristeći kemijski spoj GANT61, specifični inhibitor proteina GLI. Stanične linije su tretirane s pet doza kemijskog spoja te je izmjerena vijabilnost stanica 72 sata nakon tretmana. Vidljivo je da GANT61 smanjuje preživljenje stanica s povećanjem koncentracija, no između linija može se vidjeti razlika u osjetljivosti na GANT61. Za većinu staničnih linija doza LD50 nalazi se u rasponu 5-15  $\mu\text{M}$  GANT61, iako određene linije poput Mel 224 pokazuju inicijalnu otpornost u tim dozama (Slika 4.4).

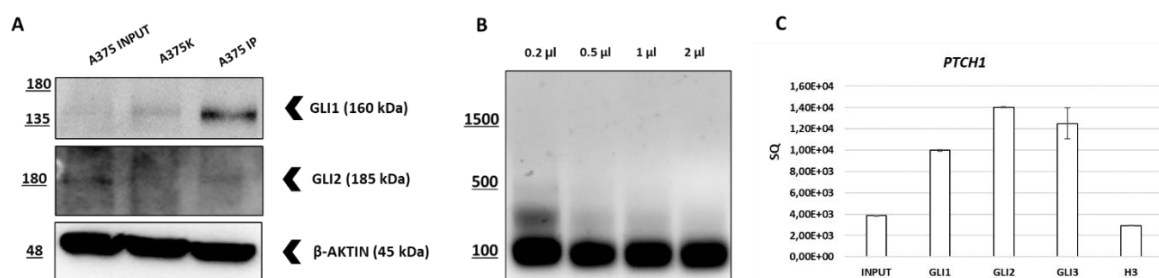


**Slika 4.4.** Vijabilnost staničnih prema mutacijskom statusu gena *BRAF* i *NRAS* nakon inhibicije signalnog puta HH-GLI kemijskim spojem GANT61 72 sata nakon tretmana. Na apscisi su izražene koncentracije pojedinog spoja, a na ordinati postotak vijabilnih stanica. Bojama je označen mutacijski status staničnih linija: crno (zdrava koža), crveno (melanom bez mutacija *BRAF/NRAS*), plavo (mutacija *BRAF*), zeleno (mutacija *NRAS*), žuto (mutacija *KRAS*), a stilom linija tip alela: puna linija (heterozigot), isprekidana linija (homozigot).

Navedeni rezultati pokazuju da su stanične linije melanoma osjetljive na inhibiciju proteina GLI. Vidljivo je da su najosjetljivije stanične linije s heterozigotnom mutacijom *BRAF* (plave pune linije, Slika 4.4). Umjerenu osjetljivost pokazuju stanične linije s mutacijom u genu *NRAS* te stanične linije divljeg tipa. Stanične linije s homozigotnom mutacijom *BRAF* i stanična linija s mutacijom u genu *KRAS* pokazuju najmanju osjetljivost. Ovi rezultati ukazuju na to da potencijalno postoji različita regulacija signalnog puta HH-GLI u staničnim linijama melanoma s mutacijama u genima *BRAF* i *NRAS*.

## 4.2 Optimizacija parametara i validacija reakcije ChIP-seq

Nativnom imunoprecipitacijom kromatina uz sekvenciranje (ChIP-seq) utvrđuje se na koje se slijedove u DNA vežu transkripcijski faktori od interesa, u našem slučaju GLI1, GLI2 i GLI3. Kako bi bili sigurni da reakcija ChIP-seq bude što kvalitetnija, potrebno je određene korake optimizirati. Prije same reakcije, potrebno je validirati protutijela kako bi bili sigurni da će se tijekom imunoprecipitacije specifično vezati samo proteini od interesa. Protutijela za proteine GLI1 i GLI2 su uspješno validirana reakcijom imunoprecipitacije te su proteini detektirani na očekivanim veličinama (Slika 4.5A). Protutijela GLI1 i GLI2 odabrana su na temelju ranije objavljene publikacije iz 2019. godine Ali i suradnika koji su radili analizu transkripcijskih meta proteina GLI1 i GLI2 u hondrocitima koristeći metodu ChIP-seq (238). Kod GLI1 vidljiva je slaba vrpca u uzorku ukupnih proteina (INPUT), no nakon reakcije imunoprecipitacije, u uzorku je detektiran protein. Kod GLI2 vrpce su dosta slabe, ali na odgovarajućoj veličini. Protutijelo za protein GLI3 korišteno je u prethodnim ranijim studijama našeg laboratorija te je validirano za reakciju imunoprecipitacije (239).

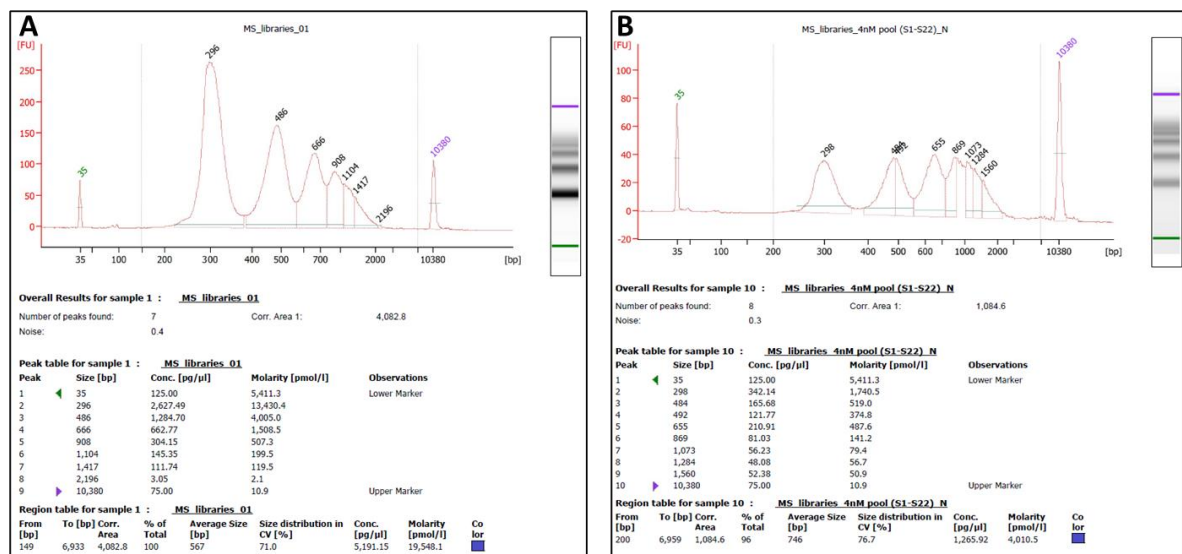


**Slika 4.5.** Optimizacija parametara bitnih za reakciju ChIP-seq. A) Validacija protutijela na staničnoj liniji A375. B) Optimizacija kromatinske digestije. C) Provjera reakcije ChIP analizom gena *PTCH1*. SQ označava početnu količinu (eng. *Starting Quantity*) analiziranog gena.

Osim validacije protutijela, važan korak koji se mora optimizirati je sama kromatinska digestija. Fiksirani kromatin mora se enzimatski pocijepati kako bi se dobio profil fragmenata duljine u rasponu 100 – 900 parova baza koji su za ChIP-seq najpoželjniji. Za optimizaciju korištena je DNA stanične linije A375 koja je fragmentirana upotrebom različitih koncentracija enzima mikrokokalne nukleaze prema preporukama proizvođača kompleta (0,2 µl, 0,5 µl, 1 µl i 2 µl) (Slika 4.5B). Uvjeti s 0,5 µl mikrokokalne nukleaze dali su optimalni raspon veličine fragmenata. Kako bi se prije same analize dobivenih podataka provjerilo da je imunoprecipitacija bila uspješna, analizirana je početna količina (eng. SQ-*Starting Quantity*) *PTCH1* u uzorcima biblioteka (Slika 4.5C) metodom kvantitativnog PCR-a. Analiza početne količine *PTCH1* može nam pokazati je li došlo do očekivanog zasićenja *PTCH1* u uzorcima biblioteka. *PTCH1* direktna je transkripcijska meta signalnog puta HH-GLI te se iz toga razloga može koristiti za kontrolu kvalitete reakcije. U odnosu na kontrolu INPUT koja predstavlja

razrijeđenu ukupnu genomsku DNA, u uzorcima biblioteka gdje je izvršena imunoprecipitacija kompleksa DNA i proteina od interesa (GLI1, GLI2, GLI3) vidljivo je zasićenje *PTCH1* za sva tri proteina GLI koje je minimalno 5 puta veće u odnosu na negativnu kontrolu. U negativnoj kontroli, histonu H3, također je detektiran *PTCH1*, ali u mnogo manjoj količini od uzoraka gdje je izvršena imunoprecipitacija pomoću specifičnih protutijela.

Prije samog sekvenciranja, pripremljene biblioteke analizirane su na uređaju Bioanalyzer koji daje informacije o kvaliteti DNA te profilu veličina fragmenata. Pripremljene biblioteke analizirane su zasebno te također nakon pripreme finalne ukupne biblioteke koja sadrži sve biblioteke pomiješane u tzv. *library pool*. Kao primjer prikazan je elektroferogram jedne od pripremljenih biblioteka na kojoj se vidi da dominira raspon veličina kromatinskih fragmenata 300 - 1000 parova baza (4.6A). Unutar analiziranog spektra nema fragmenata manjih od 100 parova baza koji mogu predstavljati zaostale adaptore i indeksirane početnice. Na kapilarnoj elektroforezi vide se vrpce odgovarajućih veličina koje su jasne čime je pokazano da je integritet DNA očuvan. Uređaj također daje informacije o koncentraciji uzorka na temelju koje se priprema ukupna biblioteka. Analizirana ukupna biblioteka također sadrži kromatinske fragmente u rasponu željenih veličina bez onečišćenja te je željene molarnosti od 4 pmol/L (Slika 4.6B).

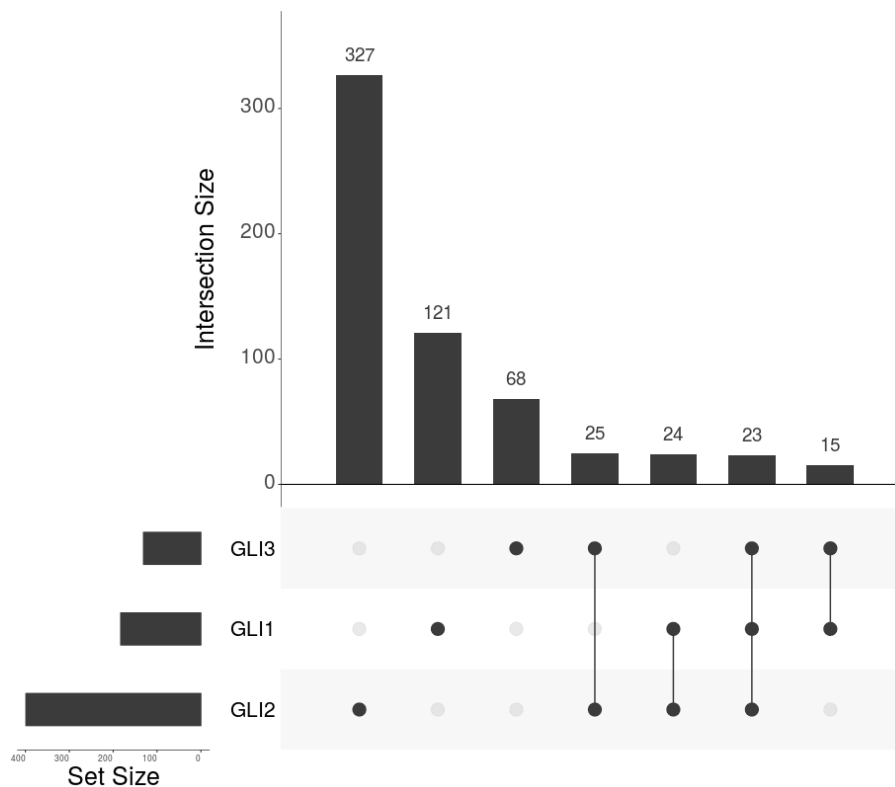


**Slika 4.6.** Provjera uzoraka biblioteka na uređaju Bioanalyzer. A) Elektroferogram pojedinačne DNA biblioteke. B) Elektrogram ukupne DNA biblioteke (sastavljene od 24 pojedinačna uzorka).



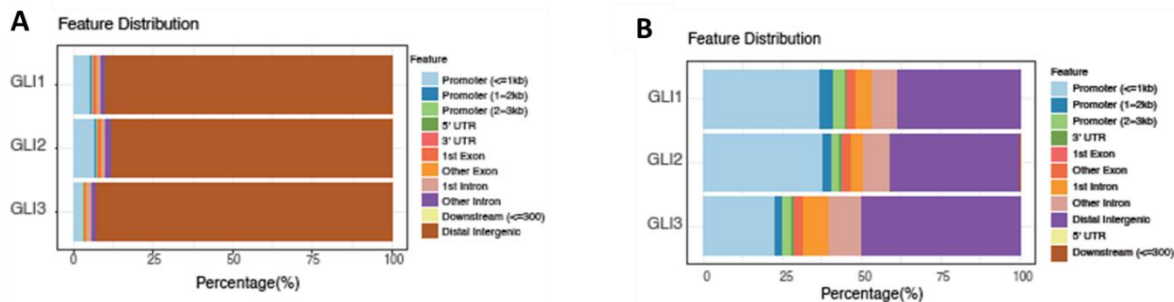
### 4.3 Analiza rezultata ChIP-seq

Nakon analize rezultata ChIP-seq pokazalo se da je pokrivenost sekvenciranja bila nešto manja od očekivane. Zbog toga su se podaci dobiveni za sve tri stanične linije za potrebe analize trebali spojiti u jedinstveni uzorak za svaki transkripcijski faktor, GLI1, GLI2 te GLI3. Ukupno je detektirano 603 ciljnih gena, od čega su 183 potencijalna meta transkripcijskog faktora GLI1, 399 meta GLI2 i 131 meta GLI3. Zanimljivo je da svega 23 gena (3,8 %) predstavljaju preklapajuće mete sva tri transkripcijska faktora, što dokazuje da svaki od proteina ima svoje specifične funkcije (Slika 4.7).



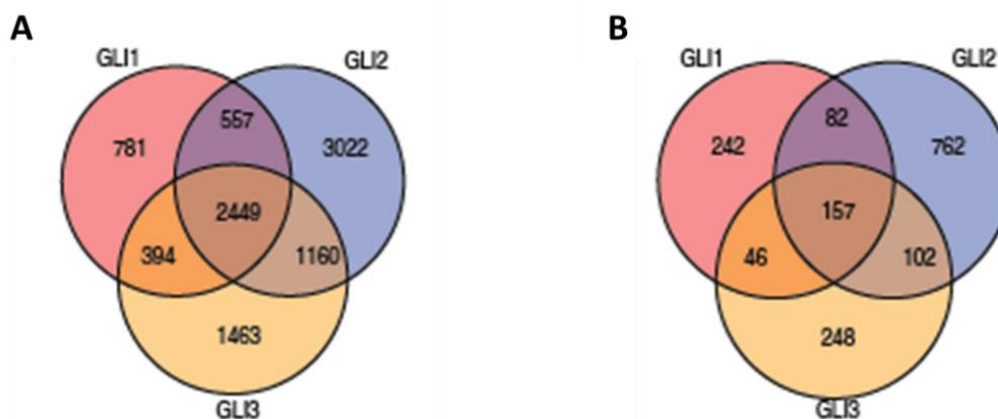
**Slika 4.7.** Prikaz identificiranih transkripcijskih meta za pojedini protein GLI te međusobno preklapljenih meta. Na apscisi se nalaze kombinacije transkripcijskih faktora GLI1, GLI2 i GLI3, a na ordinati broj identificiranih potencijalnih transkripcijskih meta.

Analizom transkripcijskih veznih mjesta proteina GLI, vidljivo je da više od 80 % veznih mjesta otpada na intergenske regije, što se može povezati sa svojstvom pojačivača transkripcije koje proteini GLI posjeduju. Kada se promatraju vezna mjesta isključivo na razini promotora gena, vidljivo je da je podjednak udio veznih mjesta koja se nalaze direktno u promotoru te veznih mjesta u udaljenijim intergenskim regijama (Slika 4.8).



**Slika 4.8.** Pozicije veznih mjesta transkripcijskih faktora GLI1, GLI2, i GLI3. A) vezna mjesta na razini cijelog genoma. B) vezna mjesta na razini promotora gena. Na apscisi je označen postotak u pojedinoj genskoj regiji, a na ordinati transkripcijski faktori GLI1, GLI2 i GLI3.

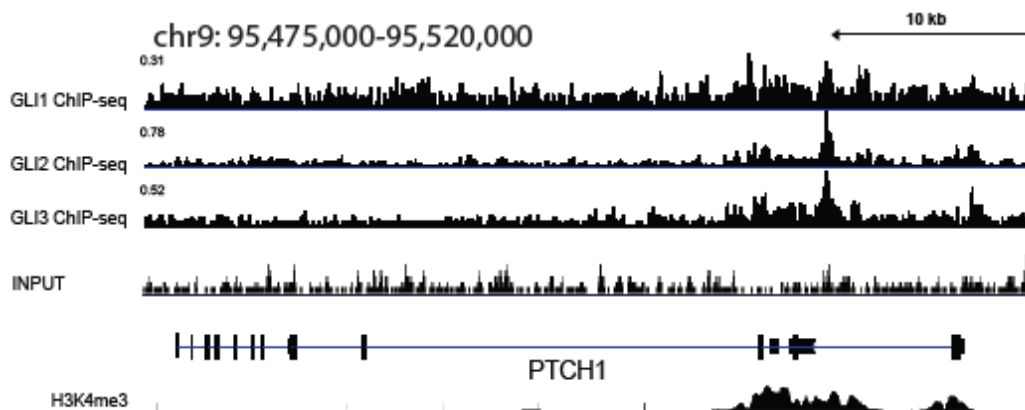
Na razini cijelog genoma pronađeno je ukupno 9862, a u promotorskih regijama 1639 veznih mjesta. U oba slučaja, najveći broj veznih mjesta ima protein GLI2. Proteini GLI2 i GLI3 na razini cijelog genoma i promotora imaju najveći broj preklapajućih veznih mjesta. Najmanji broj preklapanja u veznim mjestima imaju proteini GLI1 i GLI3 što nije iznenađujuće s obzirom da GLI1 djeluje isključivo kao aktivator signalnog puta, a GLI3 dominantno kao represor. Na razini cijelog genoma, sva tri proteina GLI imaju zajednička 2449 vezna mjesta, što nije neobično s obzirom da su konzensus sekvence koje proteini GLI prepoznaju međusobno jako slične (Slika 4.9).



**Slika 4.9.** Vennovi dijagrami za broj specifičnih te međusobno preklapajućih veznih mjesta proteina GLI1, GLI2 i GLI3. A) na razini cijelog genoma. B) na razini promotora gena.

Prije daljnjih analiza gena, provjereno je nalaze li se na listi identificiranih gena već poznate transkripcijske mete proteina GLI, kao što je *PTCH1*. Na listi identificiranih gena pronađen je *PTCH1*, nakon čega je analizirana distribucija očitavanja (eng. *peak*-ova) u regiji gena (Slika 4.10). U analiziranoj regiji gena *PTCH1* (chr9: 95,475,000-95,520,000) vidljiv je veći broj očitavanja u promotorskim regijama za sva tri proteina GLI u odnosu na okolne regije, s najvišim vrhom na poziciji uzvodno od eksona 1B, u kojem se nalazi promotorska regija sa CpG

otocima za gen *PTCH1*. Kod GLI2 i GLI3 su očitavanja u promotoru gena *PTCH1* jasno izražena, dok je kod GLI1 pozadinski šum nešto izraženiji. U kontroli INPUT koju predstavlja ukupna razrijeđena genomska DNA nema takvih jakih specifičnih očitavanja. Pozitivna kontrola, histon H3K4me3, koji se koristi za identifikaciju aktivnih promotora, u analiziranim regijama također ima očitavanja koja se preklapaju s profilima opaženima kod proteina GLI.



**Slika 4.10.** Distribucija očitavanja u regiji gena *PTCH1* za ukupne podatke ChIP-a proteina GLI1, GLI2, GLI3. Kontrola INPUT predstavlja ukupnu razrijeđenu genomsku DNA. Histon H3K4me3 predstavlja pozitivnu kontrolu - mjesta transkripcijski aktivnog kromatina. Plava linija predstavlja shematski prikaz genomske regije *PTCH1*, s pozicijama eksona označenim crnim pravokutnicima.

Od identificiranih gena, najveći udio otpada na gene koji kodiraju za proteinske produkte (91,87 %). Manji dio otpada na gene koji kodiraju za miRNA (3,3 %) te lncRNA (4,8 %). Detektirane liste gena analizirane su s nekoliko javno dostupnih mrežnih programa. Za analizu povezanosti popisa gena s bolestima korišten je alat Gene Set to Diseases (GS2D) Sveučilišta u Mainz (240). U tablici 4.1 prikazano je 10 najzastupljenijih kategorija bolesti s kojima su identificirane transkripcijske mete povezane. Najveći dio transkripcijskih meta povezuje se s genetskom predispozicijom za bolesti, stvaranju neoplazmi, invazivnošću neoplazmi te raznim individualnim tipovima tumorskih oboljenja. Za analizu funkcija u koje su uključeni detektirani geni korišten je ConsensusPathDB-human, alat Max Planck Instituta (241). U tablici 4.2 je prikazano 20 najzastupljenijih kategorija među kojima su metabolizam proteina, transdukcija signala, transkripcija, odgovor stanice na stres te stanični ciklus.

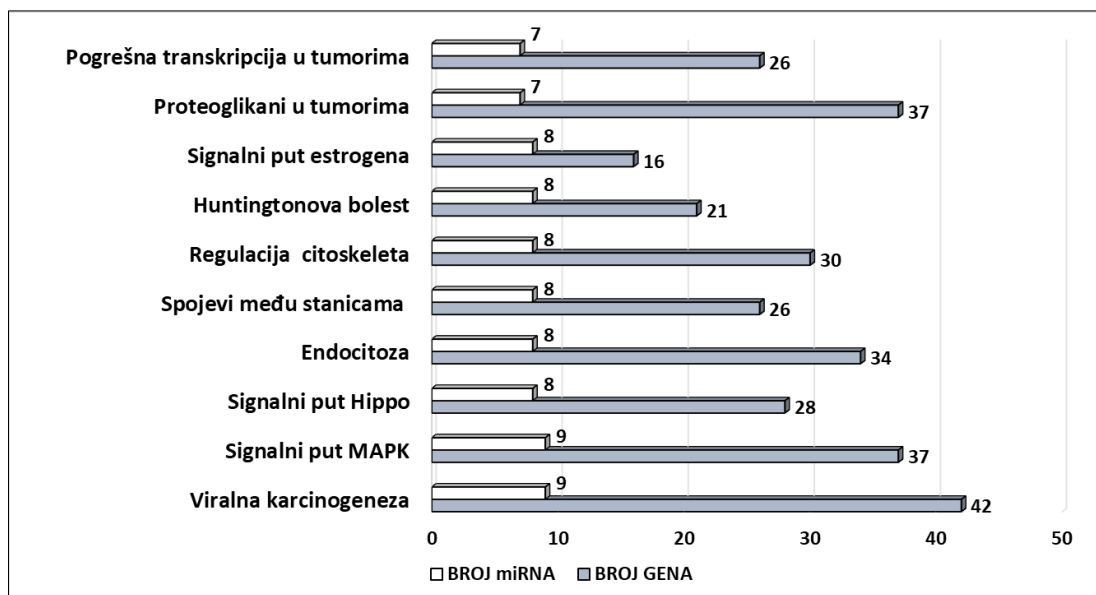
**Tablica 4.1.** Analiza povezanosti identificiranih transkripcijskih meta proteina GLI s bolestima ([http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~jfontain/cms/?page\\_id=592](http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~jfontain/cms/?page_id=592)).

BOLEST	BROJ GENA	%	GENI
Genetska predispozicija za bolesti	56	16 %	ADA APOD BMP2 CBR3 CDC6 CDKN2C CHEK1 COL9A3 CYP24A1 FOXO3 FLG FUS GALNT2 GRIK2 JAK2 LAMC1 MCM4 MYC NAB2 NINJ1 PSEN2 PTCH1 PTPN1 SCN8A SDC4 SOS1 SREBF1 KLF10 YWHAZ LRP8 PSCA MLLT10 IRS2 BCL2L1 SH2B3 SPRY2 MERTK PITRM1 FAF1 KLF12 NEDD4L USP24 SIRT1 POLR1D CCNL1 NMNAT1 MUS81 CEP63 SPRY4 TRAPPC9 IMMP2L LZTS2 STXBP5 TMC8 SPRED2 C9orf72
Tumori dojke	32	9 %	ARF1 CBR3 CDC25A CDKN2C CHEK1 MAPK14 CYP24A1 DHX9 FOXO3 GLI1 HSF1 HSPA8 KPNA2 LASP1 MYC PSAP SLC5A5 FSCN1 YWHAZ LMO4 STUB1 CITED2 TUBA1B DDX17 HEXIM1 UBE2C SGK3 HBP1 SULF2 SMURF2 MUS81 MTDH
Invazivnost tumora	26	7 %	MAPK14 E2F3 EGR1 FOXO3 GLI1 HSF1 LAMA4 LAMC1 RPSA LASP1 MYC PKM PTPN1 PTPN12 FSCN1 SOX4 YWHAZ SLC7A5 ARID1A SPAG9 SPRY2 STUB1 SIRT1 SULF2 SPRY4 MTDH
Naoplastična transformacija stanice	24	7 %	CALR CDC25A MAPK14 E2F3 FOXO3 GLI1 HES1 HSF1 JAK2 JUNB MYC PKM PLEC PTPN1 RHEB SCD5 KIL SOS1 SOX4 YWHAZ PSCA ARID1A SIRT1 MTDH
Hepatocelularni karcinom	18	5 %	CDC25A MAPK14 E2F3 EGR1 GLI1 HSF1 JUNB KPN A2 MYC PKM PTPN1 SOX4 SREBF1 YWHAZ BCL2L1 PRDX3 SIRT1 MTDH
Tumori prostate	15	4 %	CDC6 CYP24A1 DAG1 E2F3 EGR1 FOXO3 GAPDH JUND MYC PSAP SOX4 PSCA GDF15 PRDX3 SIRT1
Tumori jetre	15	4 %	CDC25A MAPK14 E2F3 GLI1 HSF1 JUNB KPNA2 MYC PKM SOX4 YWHAZ PRDX3 SIRT1 SULF2 MTDH
Tumori pluća	14	4%	CHEK1 E2F3 FOXO3 RPSA MYC PKM FSCN1 SOX4 SLC7A5 HYAL2 BCL2L1 STUB1 UBE2C MTDH
Tumori jajnika	13	4 %	CDKN2C CHEK1 MAPK14 E2F3 FOXO3 KPNA2 PLAGL1 SKIL FSCN1 ARID1A RIPK1 BCL2L1 MTDH
Ostali tumori	13	4 %	CDC25A CHEK1 DHX9 HNRNPU HSF1 MYC PKM RPL11 SMARCC1 HIST2H4A BCL2L1 TUBB4B DDX17

Od ukupno identificiranih 20 molekula miRNA, njih 9 (hsa-miR-377-3p, hsa-miR-3065-3p, hsa-miR-377-5p, hsa-miR-3194-5p, hsa-miR-3194-3p, hsa-miR-1299, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-1302, hsa-miR-1231) uključeno je u regulaciju signalnog puta RAS/RAF/MAPK (Slika 4.11). Na slici je prikazano deset najzastupljenijih funkcija gena koji su regulirani najvećim brojem detektiranih miRNA. miRNA mogu modulirati ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini te mogu predstavljati potencijalni razlog različite reakcije staničnih linija melanoma s mutacijama *NRAS* i *BRAF* na inhibiciju signalnog puta HH-GLI. Također su analizirani geni koji se povezuju s navedenih devet miRNA. Sustavom bodovanja, izdvojeno je 50 gena koji su regulirani najvećim brojem miRNA uključenih u regulaciju signalnog puta RAS/RAF/MAPK te su među njima uočene važne komponente signalnog puta RAS/RAF/MAPK kao što su *IGF1R*, *MAPK13*, *DUSP3*, *DUSP4*, *EGFR*, *MAPK14*, *SOS1*, *KRAS* i mnoge druge (Tablica 4.3).

**Tablica 4.2.** Analiza funkcija s kojima su povezane detektirane transkripcijske mete faktora GLI (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>).

Funkcija	Broj gena
Metabolizam proteina	100
Prijenos signala	95
Ekspresija gena (transkripcija)	74
Post-translacijske modifikacije proteina	71
Transkripcija RNA Polymerazom II	69
Transkripcija	62
Stanični ciklus	48
Mitoza (stanični ciklus)	46
Odgovor stanice na vanjske podražaje	45
Odgovor stanice na stres	40
Prijenos signala putem Rho GTPaza	39
Efektori RHO GTPaza	38
M faza	37
Stanično starenje	35
Enzimi koji modificiraju kromatin	35
Organizacija kromatina	35
Signalni put WNT	35
TCF-ovisan prijenos signala kao odgovor na WNT	33
Alkoholizam- Homo sapiens	32
Epigenetska regulacija ekspresije gena	31



**Slika 4.11.** Funkcije gena koji su pod regulacijom detektiranih miRNA. Od detektiranih 20 molekula miRNA, njih 9 je povezano sa signalnim putem RAS/RAF/MAPK.

**Tablica 4.3.** Popis 50 gena koji su regulirani najvećim brojem miRNA povezanih sa signalnim putem RAS/RAF/MAPK. Zeleni kvadratić označava da je gen reguliran od strane miRNA, dok bijeli kvadratić označava da nema regulacije uz pomoć ili posredovane s miRNA. Na kraju je izražena ukupna vrijednost bodovanja s obzirom na broj miRNA koji je uključen u regulaciju pojedinog gena.

GENI	hsa-miR-1231	hsa-miR-1299	hsa-miR-1302	hsa-miR-3065-3p	hsa-miR-3065-5p	hsa-miR-3194-3p	hsa-miR-3194-5p	hsa-miR-377-3p	hsa-miR-377-5p	hsa-miR-3648	hsa-miR-4477a	UKUPNO
PRKCA												9
RASA1												8
IGF1R												8
IKBKG												8
MAP2K6												8
CACNA1E												8
ELK4												8
TAOK1												7
STK4												7
TGFBR2												7
RASGRF2												7
TRAF6												7
MAPT												7
MAPK13												7
NTRK2												7
MAPK1												7
MAP3K2												7
AKT3												7
DUSP3												7
CACNB4												7
ARRB1												7
DUSP4												7
EGFR												7
AKT1												7
CACNA1D												7
CACNG8												7
RPS6KA3												6
RAP1A												6
RPS6KA6												6
PRKCB												6
PPM1A												6
MAPK14												6
IRAK1												6
MAPKAPK5												6
IGF1												6
HSPA6												6
DUSP2												6
FGF1												6
ELK1												6
CACNG2												6
FGFR2												6
CACNA1C												6
SOS1												5
RPS6KA5												5
RELA												5
MAPK9												5
MYC												5
MEF2C												5
KRAS												5

### 4.3.1 Odabir transkripcijskih meta proteina GLI za daljnju validaciju

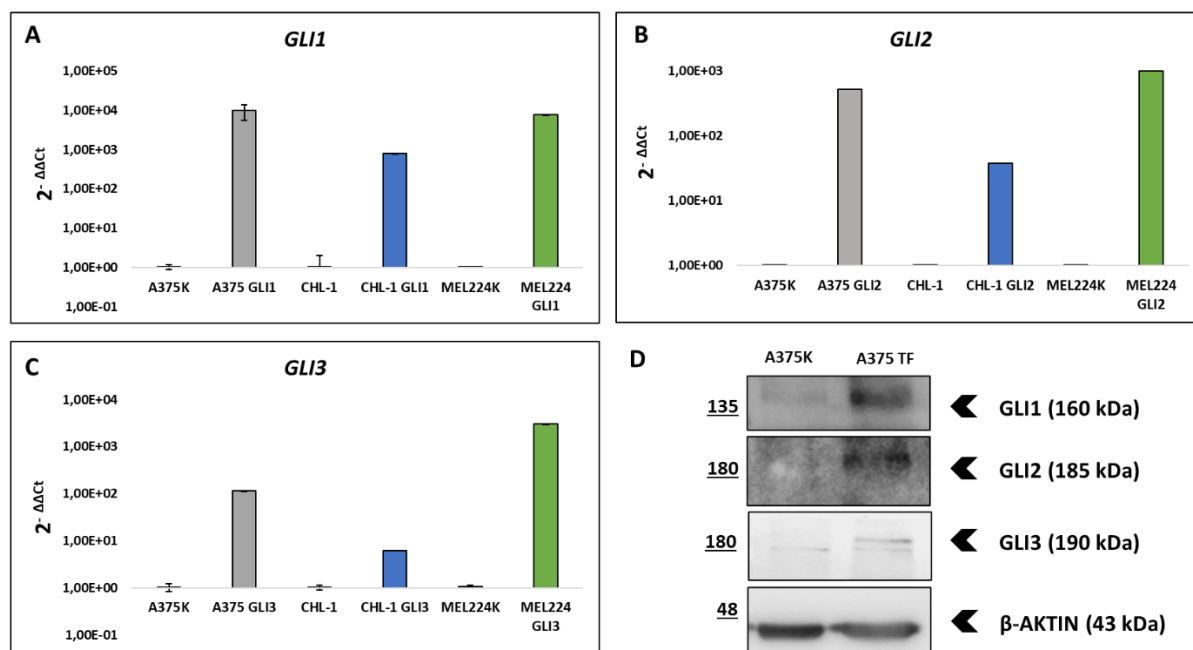
Kako bi se odabrali geni za daljnju validaciju, koristili smo nekoliko javno dostupnih mrežnih alata, kao što su platforme Genecards, String, Gepia te JASPAR (242–245). Uz korištenje navedenih platformi, analizirana je i prethodno objavljena relevantna literatura. Za daljnju validaciju odabrani su geni koji su povezani sa signalnim putem RAS/RAF/MAPK, melanomom ili drugim tipovima tumora. U konačnici su odabrana 23 gena koja kodiraju za proteine, 9 miRNA te dvije lncRNA za daljnju validaciju (Tablica 4.4). Za validaciju potencijalnih transkripcijskih meta proteina GLI1 odabrani su geni *MTDH*, *RHEB*, *CD63* i *MERTK*, lncRNA *MALAT* i *SAMMSON* te miRNA mir-1231 i mir-1302. Za validaciju potencijalnih transkripcijskih meta proteina GLI2 odabrani su geni *FOXO3*, *C-MYC*, *SOX4*, *SPRY4*, *SIRT1*, *SOS1* i *GNAQ* te miRNA mir-3065-3p, mir-3065-5p i mir-1299. Za validaciju potencijalnih meta proteina GLI3 odabrani su *MAPKp38 $\alpha$* , *BCL9* i *CDC6*, miRNA mir-377-3p i mir-377-5p. Osim specifičnih transkripcijskih meta za pojedini protein GLI, odabrane su i potencijalne preklapajuće ciljne mete. Za preklapajuće mete GLI1 i GLI2 odabrani su: *SPRY2*, *SOX10*, *FLG*, mir-3194-3p i mir-3194-5p. Za grupu preklapajućih ciljnih meta GLI2 i GLI3 odabrani su: *JAK2*, *RAB34* te *GLI1* i *PTCH1* kao poznate transkripcijske mete koje će služiti kao kontrole. Kao predstavnici grupe preklapajućih ciljnih meta sva tri proteina GLI odabrani su: *JUND*, *CDKN2C*, mir-4477a te mir-3648-2.

**Tablica 4.4.** Popis gena koji kodiraju za proteine i lncRNA za daljnju validaciju te njihovih poznatih funkcija.

GEN	FUNKCIJA	REFERENCA
<i>MTDH</i>	regulacija signalnih puteva PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B, Wnt/ $\beta$ -katenin čime promovira karcinogenezu i metastaziranje	(246)
<i>RHEB</i>	regulacije fosforilacije i dimerizacije proteina BRAF i CRAF	(247)
<i>CDC6</i>	regulacija migracije i adhezije stanica preko signalnog puta RAS/RAF/MAPK	(248)
<i>MERTK</i>	regulacija rasta tumorskih stanica s mutacijom u genu <i>BRAF</i>	(249)
<i>MALAT1</i>	regulacija staničnog ciklusa, migracije i metastaziranja	(250)
<i>SAMMSON</i>	regulacija preživljenja stanica melanoma	(251)
<i>FOXO3</i>	regulacija signalnog puta RAS/RAF/MAPK te apoptoze preko proteina p53	(252)
<i>C-MYC</i>	regulacija kemorezistencije u melanomima s mutacijom u genu <i>BRAF</i>	(253)
<i>SOX4</i>	regulacija signalnog puta RAS/RAF/MAPK, angiogeneze te staničnog ciklusa	(254)
<i>SPRY4</i>	negativni regulator signalnog puta RAS/RAF/MAPK u melanomima s mutacijama u genima <i>BRAF</i> i <i>NRAS</i>	(255)
<i>SIRT1</i>	regulacija epitelno-mezenhimalne tranzicije u melanomu	(256)
<i>SOS1</i>	regulacija aktivnosti proteina RAS	(257)
<i>GNAQ</i>	onkogen povezan s melanogenezom	(258)
<i>MAPKp38<math>\alpha</math></i>	regulacija epitelno-mezenhimalne tranzicije i migracije stanica melanoma	(259)
<i>BCL9</i>	regulacija signalnog puta Wnt	(260)
<i>CD63</i>	potencijalni tumor supresor u melanomu	(261)
<i>SPRY2</i>	negativni regulator signalnog puta RAS/RAF/MAPK u melanomima bez mutacija u genu <i>BRAF</i>	(262)
<i>SOX10</i>	regulacija rezistencije na inhibitore proteina BRAF i MEK	(263)
<i>FLG</i>	regulacija signalnog puta RAS/RAF/MAPK u keratinocitima	(264)
<i>JAK2</i>	regulacija citokina i faktora rasta	(265)
<i>RAB34</i>	regulacija staničnog transporta, ciliogeneze i signalnog puta RAS/RAF/MAPK	(266)
<i>JUND</i>	regulacija staničnog preživljenja i proliferacije preko signalnog puta RAS/RAF/MAPK	(267)
<i>CDKN2C</i>	potencijalna meta za kombiniranu terapiju s inhibitorima proteina BRAF	(268)

## 4.4 Validacija odabranih ciljnih gena

Kako bi se validirale odabrane transkripcijske mete, stanične linije A375, Mel 224 i CHL-1 su transfecirane ekspresijskim plazmidima za proteine GLI1, GLI2 te GLI3. Prije validacije gena qPCR-om, potrebno je prvo potvrditi da je transfekcija stanica bila efikasna na genskoj i proteinskoj razini. U sve tri linije, nakon transfekcije dolazi do porasta genske ekspresije analiziranog gena *GLI* u odnosu na netransfecirane stanice (Slika 4.12 A-C). Na proteinskoj razini se na primjeru stanične linije A375 vidi pojačana ekspresija proteina GLI1, GLI2 i GLI3.

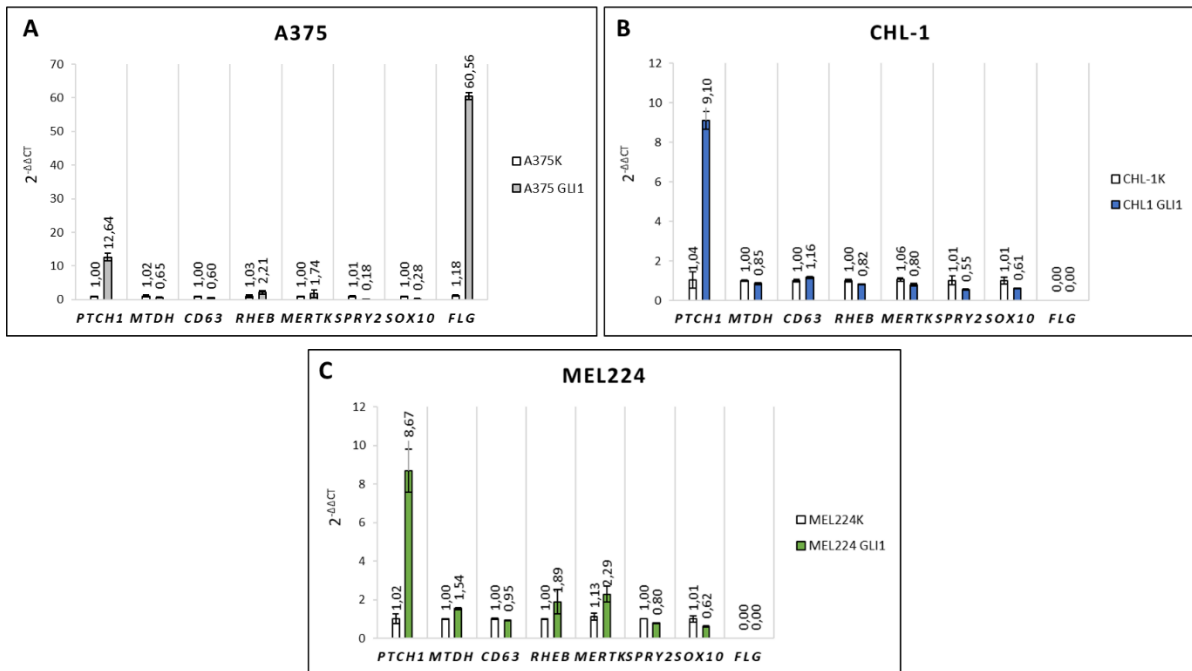


**Slika 4.12.** Validacija transfekcije staničnih linija A375, Mel 224 i CHL-1 ekspresijskim plazmidima za proteine GLI1, GLI2 i GLI3 na genskoj razini (A-C). Na apscisi su prikazani analizirani uzorci, a na ordinati izražena razina ekspresije normalizirana prema kontrolnoj netransfeciranoj liniji u obliku vrijednosti  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Validacija transfekcije na staničnoj liniji A375 na proteinskoj razini (D).

### 4.4.1 Validacija transkripcijskih meta koje kodiraju za proteinske produkte

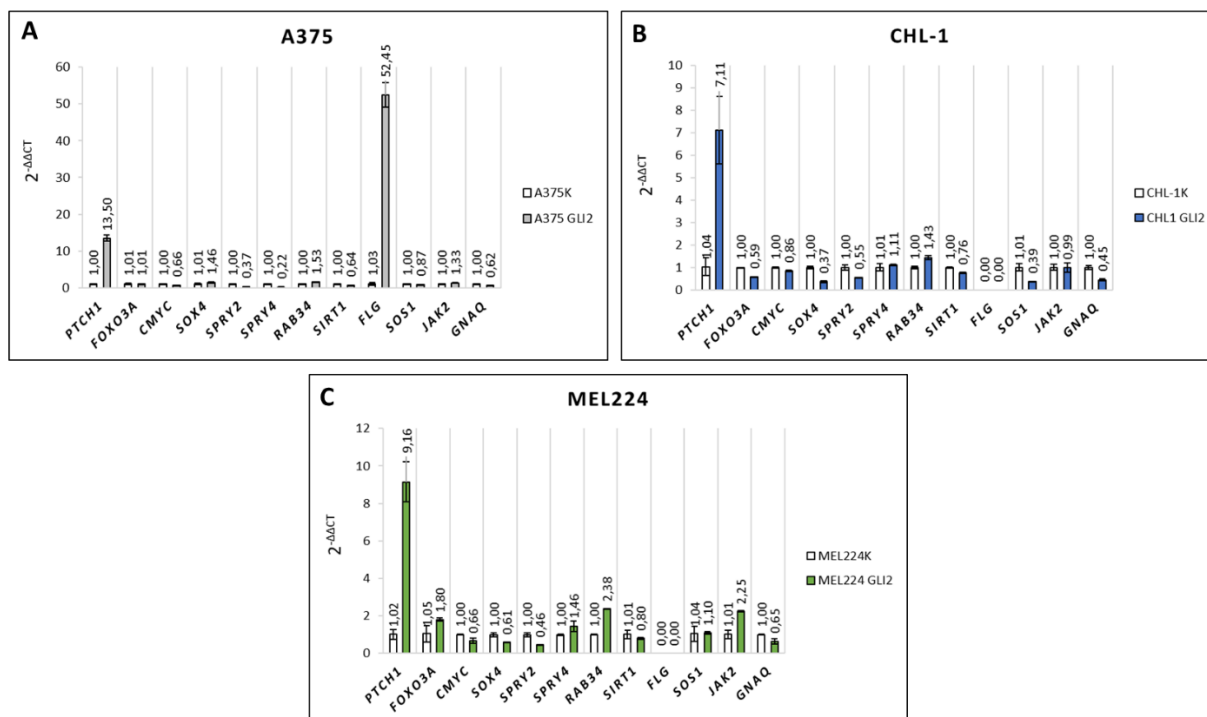
Među potencijalnim transkripcijskim metama koje kodiraju za proteinske produkte, za protein GLI1 analizirana su četiri gena: *MTDH*, *CD63*, *RHEB* i *MERTK* te *SPRY2*, *SOX10* i *FLG* kao potencijalne preklapajuće mete s GLI2 (Slika 4.13A). Kao pozitivna kontrola, analiziran je gen *PTCH1*. Kod stanične linije A375 s mutacijom u genu *BRAF*, nakon prekomjerne ekspresije proteina GLI1 raste genska ekspresija *RHEB* i *FLG*, dok opada ekspresija *SPRY2* i *SOX10*. Razina gena *PTCH1* također se ponaša očekivano. Kod stanične linije divljeg tipa, CHL-1 nijedan gen ne reagira značajno osim kontrole *PTCH1* (Slika 4.13B). Kod stanične linije s mutacijom u genu *NRAS*, Mel 224 genima *RHEB* i *MTDH* se neznatno povećava ekspresija nakon prekomjerne ekspresije GLI1 (Slika 4.13C).





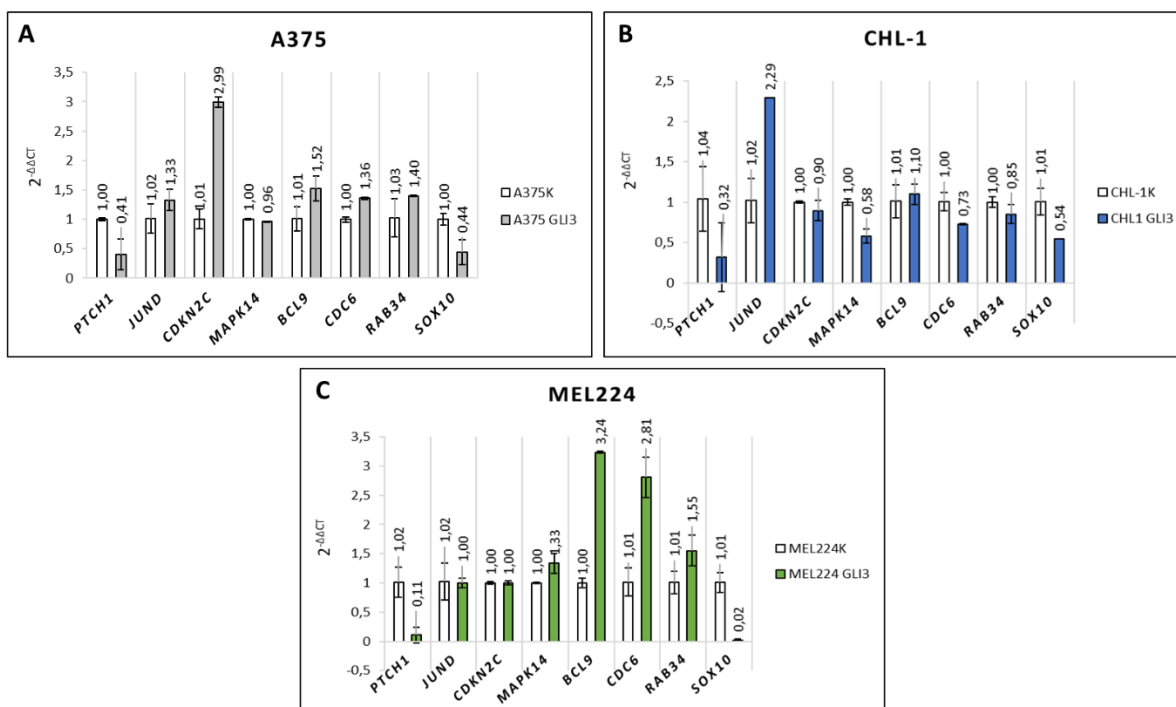
**Slika 4.13.** Validacija gena koji kodiraju za proteinske produkte nakon prekomjerne ekspresije proteina GLI1 na staničnim linijama A375, CHL-1 i Mel 224. Gen *PTCH1* služi kao kontrola. Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  nakon normalizacije na kontrolni netransfecirani uzorak.

Među potencijalnim transkripcijskim metama koje kodiraju za proteinske produkte, za protein GLI2 analizirano je 12 gena: *FOXO3*, *C-MYC*, *SOX4*, *SPRY4*, *SIRT1*, *SOS1*, *GNAQ* i *JAK2* kao specifične transkripcijske mete te *SPRY2*, *FLG* i *RAB34* kao preklapajuće mete s GLI1 i GLI3. *PTCH1* analiziran je kao pozitivna kontrola. U staničnoj liniji A375, nakon prekomjerne ekspresije GLI2 značajno raste genska ekspresija *PTCH1* i *FLG*, dok opada genska ekspresija *C-MYC*, *SPRY2*, *GNAQ*, *SPRY4* i *SIRT1* (Slika 4.14A). U staničnoj liniji CHL-1 raste ekspresija gena *PTCH1*, dok se u genima *SPRY2*, *FOXO3A*, *GNAQ*, *SOS1* i *SOX4* vidi pad u ekspresiji (Slika 4.14B). U staničnoj liniji Mel 224, nakon prekomjerne ekspresije GLI2 raste ekspresija *PTCH1*, *RAB34* i *JAK2*, dok opada ekspresija *SOX4*, *C-MYC*, *SPRY2* te *GNAQ* (Slika 4.14C).



**Slika 4.14.** Validacija gena koji kodiraju za proteinske produkte nakon prekomjerne ekspresije proteina GLI2 na staničnim linijama A375, CHL-1 i Mel 224. Gen *PTCH1* služi kao kontrola. Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  nakon normalizacije na kontrolni netransfecirani uzorak.

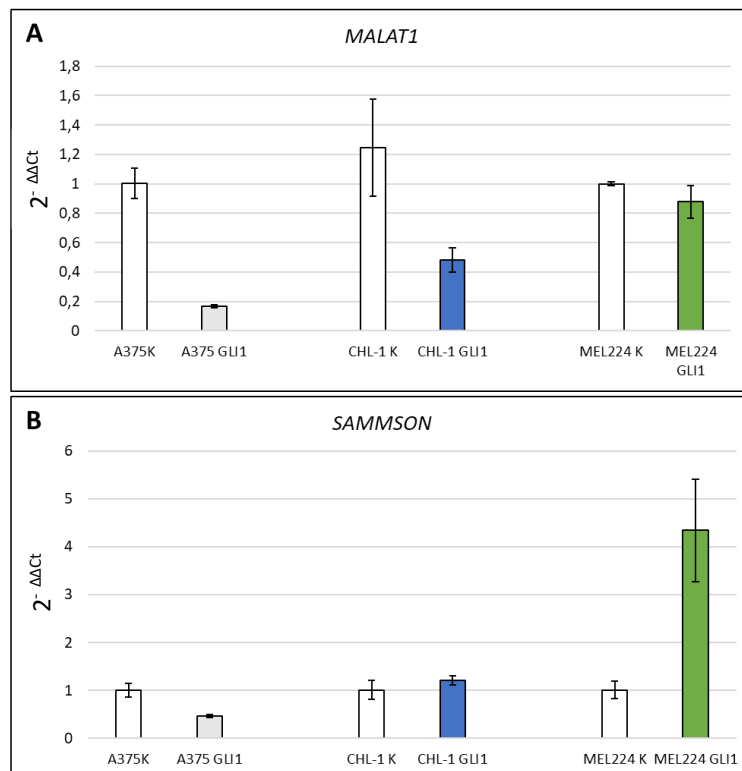
Među potencijalnim transkripcijskim metama koje kodiraju za proteinske produkte, za protein GLI3 analizirano je sedam gena: *JUND*, *CDKN2C*, *MAPKp38/MAPK14*, *BCL9*, *CDC6* kao specifične mete, *RAB34* i *SOX10* kao preklapajuće mete s GLI1 i GLI3, te *PTCH1* kao kontrola. Gen *PTCH1* u svim analiziranim linijama nakon prekomjerne ekspresije proteina GLI3 ima očekivani trend tj. smanjuje se ekspresija gena. U staničnoj liniji A375, znatno raste ekspresija gena *CDKN2C*, dok ekspresija gena *SOX10* opada. Ekspresija ostalih analiziranih gena je na razini netransfecirane kontrole (Slika 4.15A). U staničnoj liniji CHL-1, raste genska ekspresija gena *JUND*, dok se snižava ekspresija gena *MAPKp38/MAPK14* i *SOX10* (Slika 4.15B). U staničnoj liniji Mel 224 nakon prekomjerne ekspresije GLI3 znatno raste genska ekspresija gena *BCL9* i *CDC6*, dok *SOX10* opada (Slika 4.15C).



**Slika 4.15.** Validacija gena koji kodiraju za proteinske produkte nakon prekomjerne ekspresije proteina GLI3 na staničnim linijama A375, CHL-1 i Mel 224. Gen *PTCH1* služi kao kontrola. Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  nakon normalizacije na kontrolni netransfecirani uzorak.

#### 4.4.2 Validacija transkripcijskih meta koje kodiraju za lncRNA

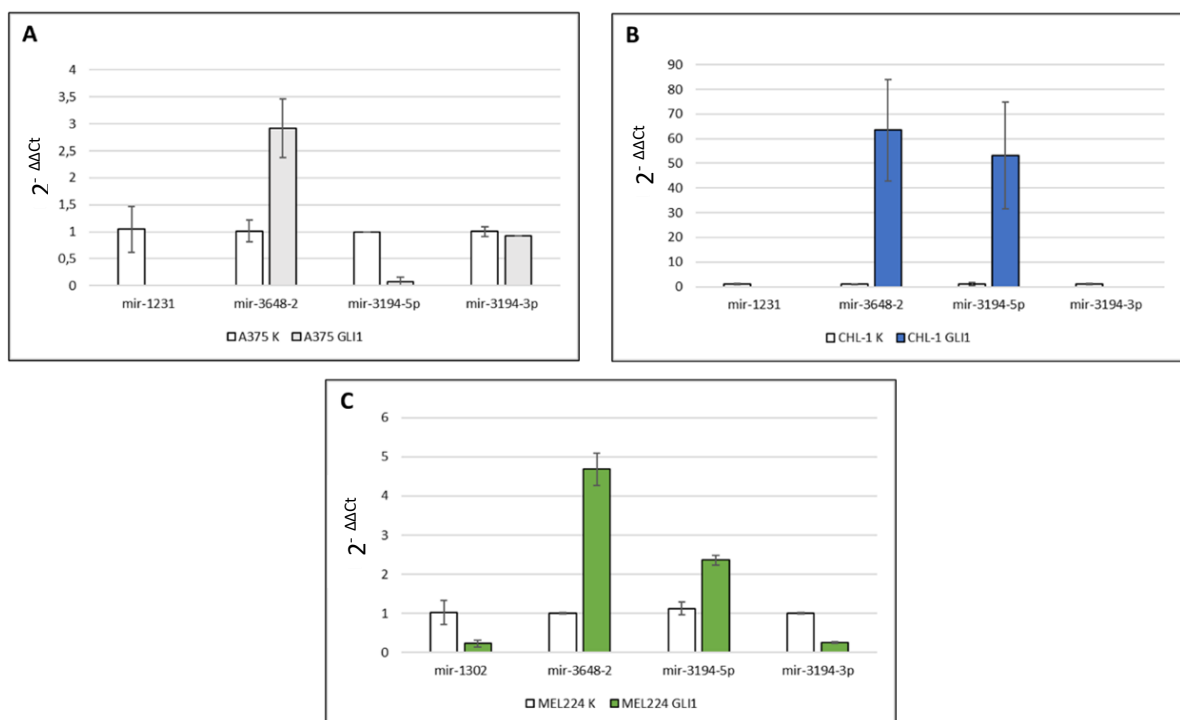
U grupi gena koji kodiraju za lncRNA analizirani su geni *MALAT1* i *SAMMSON* kao potencijalne transkripcijske mete proteina GLI1 (Slika 4.16). U staničnoj liniji Mel 224 nakon prekomjerne ekspresije GLI1 genska razina *MALAT1* ostaje na razini kontrole, dok u linijama A375 i CHL-1 dolazi do znatnog sniženja genske ekspresije. U slučaju gena *SAMMSON*, u staničnoj liniji A375 također je vidljiv pad genske ekspresije nakon prekomjerne ekspresije GLI1. U staničnoj liniji CHL-1 nema promjena, dok u Mel 224 imamo sasvim suprotan trend, rast genske ekspresije *SAMMSON*.



**Slika 4.16.** Validacija gena koji kodiraju za lncRNA *MALAT* (A) i *SAMMSON* (B) nakon transfekcije proteina GLI1 na staničnim linijama A375, CHL-1 i Mel 224. Na apscisi su označeni analizirani uzorci, a na ordinati razina genske ekspresije izražena kao vrijednost 2<sup>-ΔΔCt</sup> nakon normalizacije na kontrolni netransfecirani uzorak.

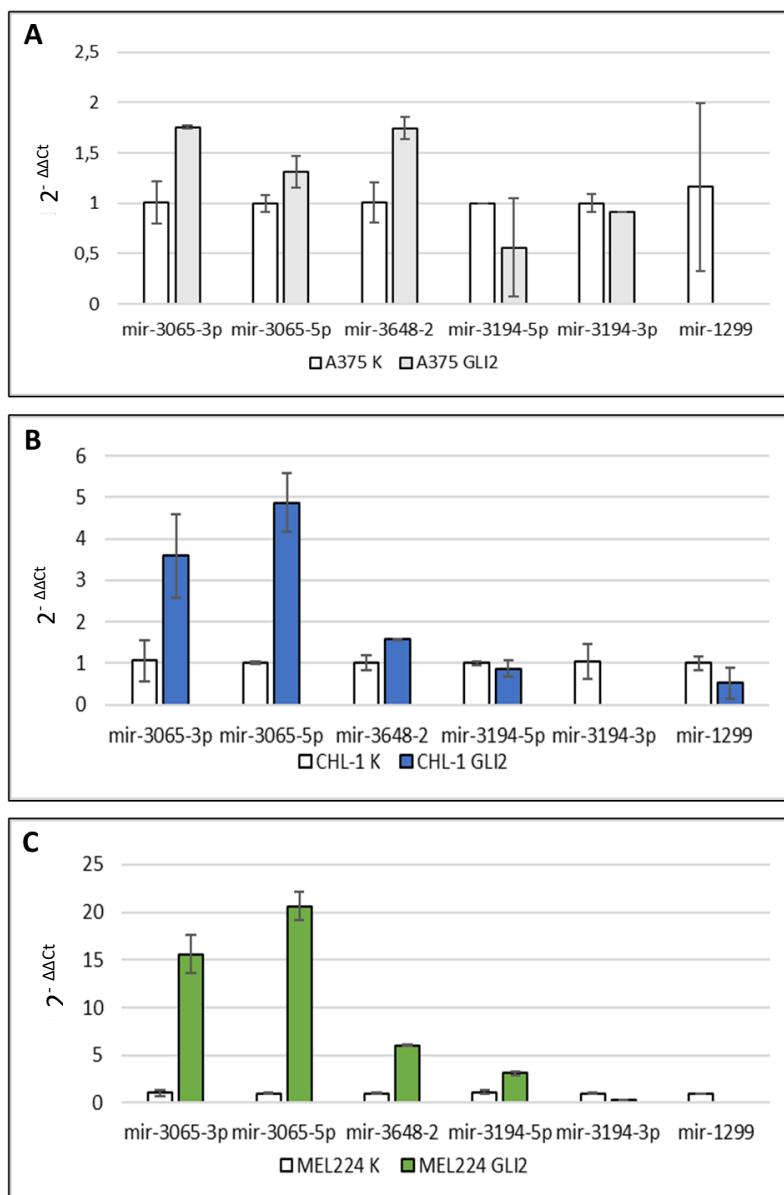
#### 4.4.3 Validacija transkripcijskih meta koji kodiraju za miRNA

U grupi potencijalnih transkripcijskih meta koje kodiraju za miRNA, za protein GLI1 analizirane su mir-1302, mir-1231, mir-3648-2, mir-3194-5p i mir-3194-3p (Slika 4.17). U staničnoj liniji A375 nakon prekomjerne ekspresije proteina GLI1 raste ekspresija mir-3648-2, a opada mir-3194-5p. mir-1231 detektirana je samo u kontrolnom uzorku, dok mir-1302 uopće nije detektirana. U staničnoj liniji CHL-1 raste ekspresija mir-3648-2 i mir-3194-5p, dok su ostale miRNA detektirane samo u kontrolnom uzorku. mir-1302 kao i u prethodnoj liniji, uopće nije detektirana. U staničnoj liniji Mel 224, također raste ekspresija mir-3648-2 te mir-3194-5p. Detektirane su također mir-1302 i mir-3194-3p, ali njihova ekspresija opada nakon prekomjerne ekspresije GLI1. mir-1231 u staničnoj liniji Mel 224 nije detektirana.



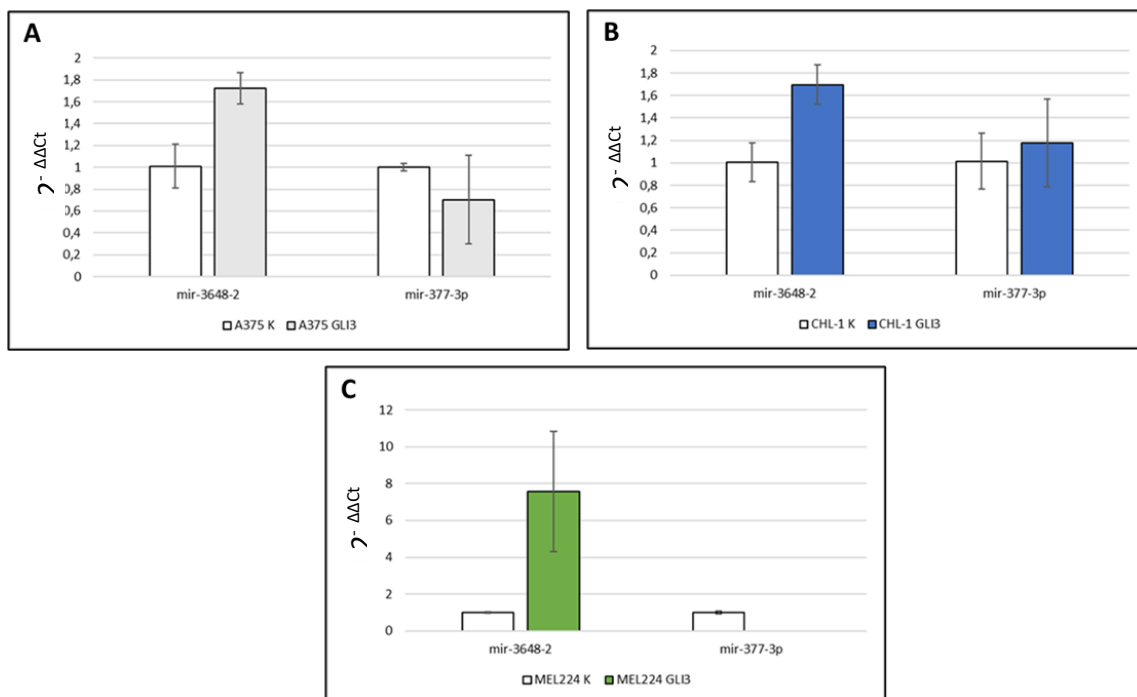
**Slika 4.17.** Validacija gena koji kodiraju za miRNA nakon transfekcije proteina GLI1 na staničnim linijama A375 (A), CHL-1 (B) i Mel 224 (C). Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  nakon normalizacije na kontrolni netransfecirani uzorak.

Kao potencijalne transkripcijske mete proteina GLI2, analizirane su miRNA: mir-3065-5p, mir-3065-3p, mir-3648-2, mir-3194-3p, mir-3194-5p te mir-1299 (Slika 4.18). U staničnoj liniji A375 dolazi do porasta genske ekspresije mir-3065 i mir-3648-2. mir-3065-3p i mir-3065-5p nakon prekomjerne ekspresije GLI2 bilježe znatan porast u ekspresiji u staničnoj liniji divljeg tip CHL-1. U staničnoj liniji Mel 224 dolazi do porasta ekspresije mir-3065-3p, mir-3065-5p te mir-3648-2.



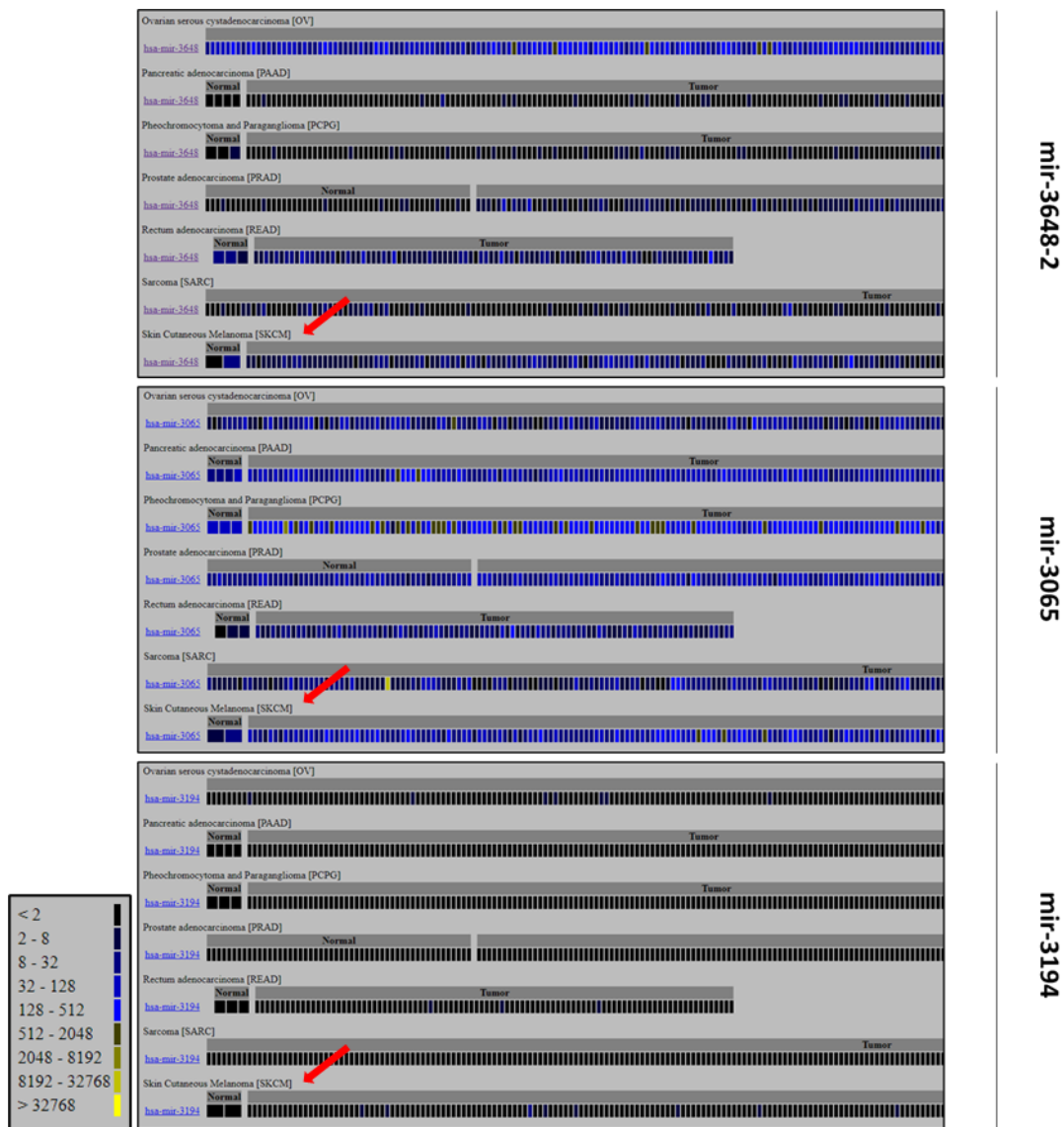
**Slika 4.18.** Validacija gena koji kodiraju za miRNA nakon transfekcije proteina GLI2 na staničnim linijama A375 (A), CHL-1 (B) i Mel 224 (C). Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  nakon normalizacije na kontrolni netransfecirani uzorak.

Kao potencijalne transkripcijske mete proteina GLI3, analizirane su miRNA: mir-3648-2, mir-377-3p i mir-377-5p (Slika 4.19). U sve tri linije, nakon prekomjerne ekspresije proteina GLI3, genska ekspresija mir-3648-2 raste, dok je mir-377-3p na razini kontrolnog uzorka. mir-377-5p nije detektirana u analiziranim uzorcima.



**Slika 4.19.** Validacija gena koji kodiraju za miRNA nakon transfekcije proteina GLI3 na staničnim linijama A375 (A), CHL-1 (B) i Mel 224 (C). Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  nakon normalizacije na kontrolni netransfecirani uzorak.

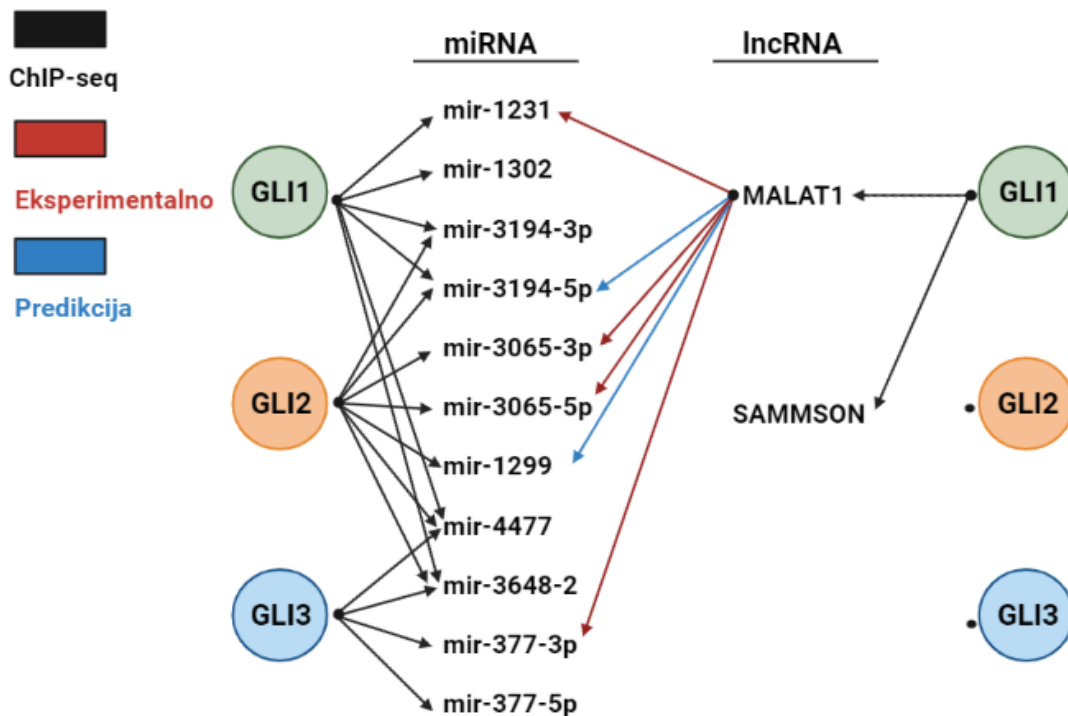
Kada se sumiraju podaci validacije odabranih miRNA, vidljivo je da mir-3648-2 reagira na prekomjernu ekspresiju sva tri proteina GLI, te predstavlja potencijalnu zajedničku metu. Kao specifična meta proteina GLI1 izdvojila se mir-3194, dok na prekomjernu ekspresiju GLI2 najbolje reaguju mir-3065-3p i mir-3065-5p. Navedene miRNA analizirane su na platformi OncoMir Cancer Database (OMCD) gdje se mogu pronaći podaci sekvenciranja miRNA iz tkiva pacijenata (Slika 4.20).



**Slika 4.20.** Analiza povezanosti ekspresije miRNA mir-3648, mir-3065 i mir-3194 s tumorskim oboljenjima pacijenata u bazi podataka OncoMir Cancer Database (OMCD). Crna boja označava nisku razinu ekspresije, plava boja osrednju, a spektar žutih boja snažnu ekspresiju. Crvenim strelicama označeni su skupovi uzoraka melanoma za pojedinu miRNA.

mir-3648 i mir-3065 imaju snažnu ekspresiju u raznim tipovima tumora među kojima je i melanom, dok mir-3194 nije ekspimiran uopće u tumorima. S obzirom na poznatu međuregulaciju miRNA i lncRNA, pomoću online platforme Diana Tools LNC base v.3 istraženo je postoje li potencijalna vezna mjesta za lncRNA među analiziranim miRNA. Na temelju naše validacije i podataka iz navedene platforme, napravljena je shema eksperimentalno potvrđenih te prediktivnih interakcija analiziranih miRNA i lncRNA (Slika 4.21).





**Slika 4.21.** Shema potencijalnih interakcija analiziranih miRNA, lncRNA i proteina GLI na temelju validacije ChIP-a te podataka s platforme Diana LNC base v.3. Crnim strelicama označene su interakcije dobivene na temelju analize rezultata ChIP-a, crvenom prethodno eksperimentalno potvrđene interakcije, a plavom prediktivne interakcije.

Kada se objedine podaci, vidljivo je da lncRNA *MALAT1* ima vezna mjesta za nekoliko miRNA, u slučaju mir-1231, mir-3065-3p, mir-3065-5p te mir-377-5p ta vezna mjesta su eksperimentalno potvrđena, a u slučaju mir-3194-5p i mir-1299 vezna mjesta su prediktivna na temelju analize komplementarnosti slijedova miRNA i lncRNA. U svakom slučaju, identificirane interakcije bilo bi korisno u budućim studijama ispitati te vidjeti kako proteini GLI utječu na regulaciju istih. Među analiziranim miRNA nisu pronađena vezna mjesta za lncRNA *SAMMSON*.

## 4.5 Uspostava staničnih linija rezistentnih na GANT61

Kako bi se uspostavile rezistentne stanične linije, stanice su tretirane tijekom 8-12 mjeseci rastućim dozama spoja GANT61. Kada bi stanice rasle normalno u koncentraciji spoja GANT61 koja je barem 1-2 puta veća od doze LD50 validirane su testom MTT. Istovremeno ispitano je djeluje li i na koji način stjecanje rezistencije na osjetljivost na druge inhibitore HH-GLI i RAS/RAF/MAPK: litijev klorid (LiCl), ciklopamin (CYC), vismodegib (VDB), sonidegib (SDB), arsenov trioksid (ATO) i salirasib (SAL).

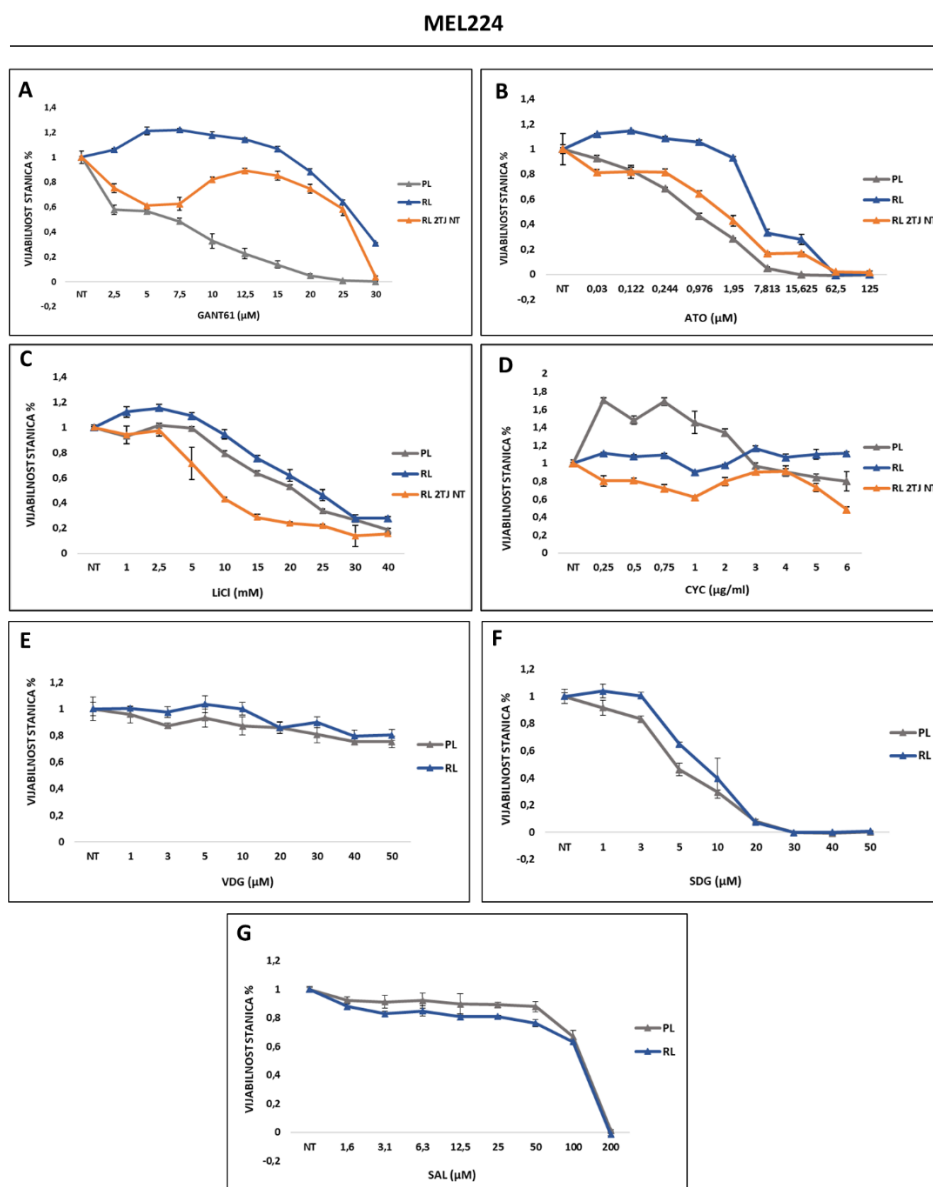
### 4.5.1 Validacija uspostavljenih staničnih linija rezistentnih na GANT61

Nakon što smo ustanovili da stanične linije Mel 224 i CHL-1 preživljavaju koncentracije GANT61 koje su 1-2 puta barem veće od njihove doze LD50, napravljen je test MTT kako bi se uspostavljene linije i validirale. Kod rezistentne stanične linije Mel 224 s mutacijom *NRAS* zabilježen je pomak vrijednosti LD50 GANT61 s 11,97  $\mu\text{M}$  na 29,73  $\mu\text{M}$ . Razvijajući rezistenciju na GANT61, stanična linija Mel 224 pokazuje kratkotrajnu nespecifičnu križnu otpornost na arsenov trioksid (ATO), neselektivni inhibitor proteina GLI. Reakcija na inhibitore litijev klorid (LiCl), ciklopamin (CYC), vismodegib (VDG), sonidegib (SDG) i salirasib (SAL) nije značajno promijenjena (Slika 4.22). Iako sonidegib i vismodegib inhibiraju protein SMO, uočena je velika razlika u aktivnosti između ova dva spoja. Vismodegib gotovo nema učinka. Naime, pri najvećoj koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$ , gotovo 90 % stanica je vijabilno, dok sonidegib gotovo u potpunosti smanjuje preživljenje stanica pri dozi od 20  $\mu\text{M}$ . Uočeni trend odgovara kliničkim opažanjima koji također potvrđuju bolju efikasnost sonidegiba (269).

Kako bi bili sigurni da se radi o pojavi rezistencije a ne o privremenoj toleranciji terapije, stanična linija Mel 224 održavana je dva tjedna bez tretmana, nakon čega je test MTT ponovljen (narančaste linije Slika 4.22). Vidljivo je da je otpornost na GANT61 očuvana te da je došlo do promjene oblika same krivulje vijabilnosti stanica (LD50 27,64  $\mu\text{M}$ ). Vijabilnost stanica niža je s manjim dozama spoja, nakon čega se povećava te postupno pada. Ovakav oblik krivulje ukazuje na to da su stanice na neki način postale "ovisne" o tretmanu s GANT61 (270). Unakrsna otpornost na arsenov trioksid izgubila se tijekom perioda netretiranja, što ukazuje na to da se radilo o nespecifičnoj otpornosti. Reakcija na ostale inhibitore je ostala nepromijenjena.

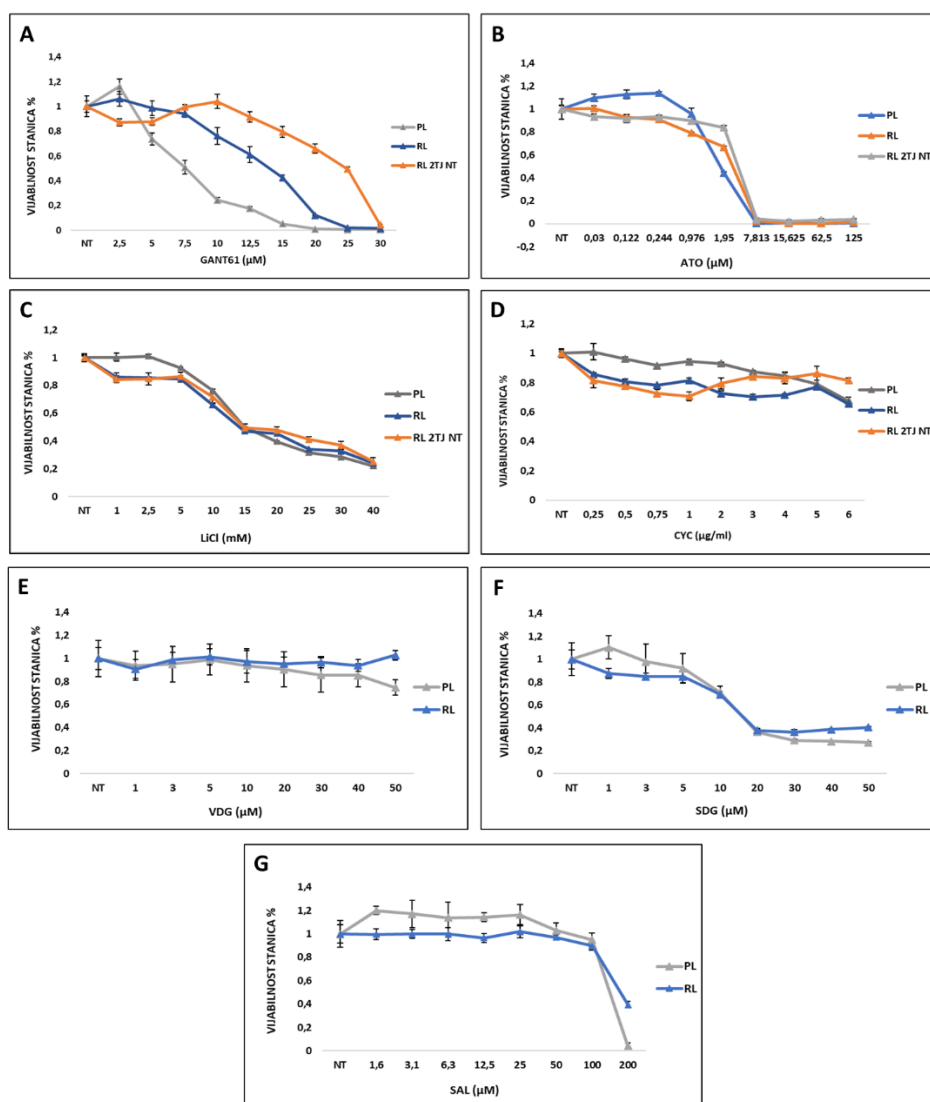
Kod stanične linije divljeg tipa, CHL-1 zabilježen je pomak u dozi LD50 na GANT61 s 5,76  $\mu\text{M}$  na 13,86  $\mu\text{M}$ , dok se reakcija na ostale inhibitore ATO, LiCl i CYC nije značajno promijenila (Slika 4.23, plave linije). Kako bi se provjerilo radi li se o stvarnoj rezistenciji, ispitan je odgovor stanica na inhibitore nakon dva tjedna bez tretmana s GANT61 (Slika 4.23, narančaste linije). Otpornost na GANT61 zadržana je kod stanične linije CHL-1 i nakon dva tjedna bez tretiranja stanica pokazujući da je stanična linija rezistentna na GANT61 (LD50 24,62  $\mu\text{M}$ ), dok se

odgovor na ostale inhibitore HH-GLI nije promijenio. Kao i u slučaju stanične linije Mel 224, vidljiv je jači efekt sonidegiba na smanjenje vijabilnosti stanica u odnosu na vismodegib. Zanimljivo, reakcija na salirasib razlikuje se između kontrolne i rezistentne stanične linije. Dok najveća koncentracija salirasiba u potpunosti smanjuje vijabilnost stanica, u rezistentnoj staničnoj liniji, oko 40 % stanične populacije još je uvijek vijabilno.



**Slika 4.22.** Validacija stanične linije Mel 224 rezistentne na GANT61 testom MTT. Stanična linija tretirana je s devet koncentracija kemijskih spojeva GANT61 (A), ATO (B), LiCl (C), CYC (D), VDG (E), SDG (F) i SAL (G) označenih na apscisi te je vijabilnost izmjerena 72 sata nakon tretmana. Na ordinati je označen postotak vijabilnih stanica. PL (sivo) označava parentalnu liniju, RL (plavo) uspostavljenu rezistentnu staničnu liniju, a RL 2TJ NT (narančasto) rezistentnu staničnu liniju koja nije tretirana u periodu od dva tjedna.

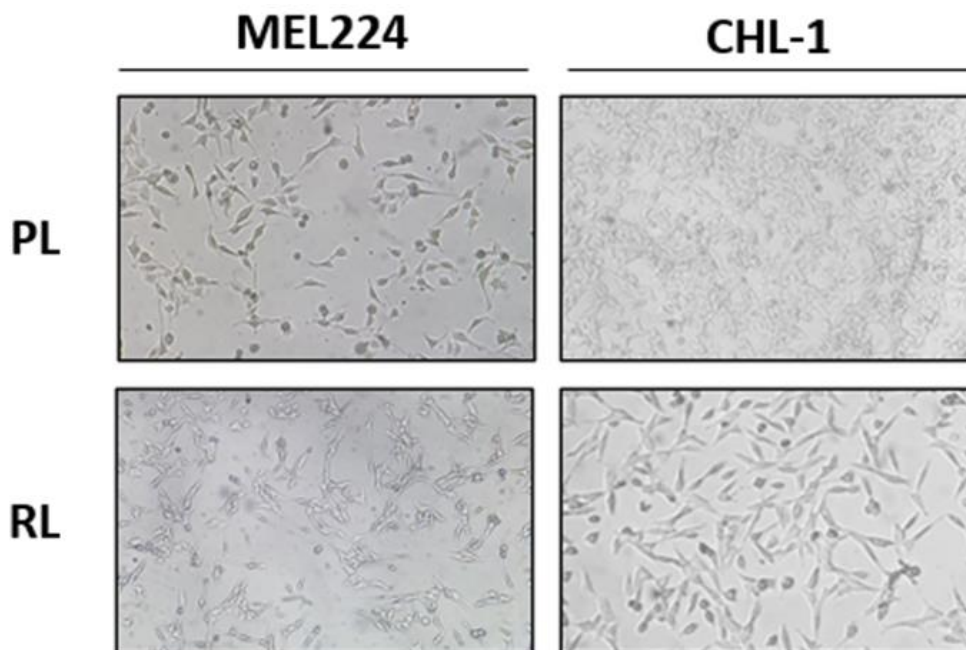
### CHL-1



**Slika 4.23.** Validacija stanične linije CHL-1 rezistentne na GANT61 testom MTT. Stanična linija tretirana je s devet koncentracija kemijskih spojeva GANT61 (A), ATO (B), LiCl (C) i CYC (D) označenih na apscisi te je vijabilnost izmjerena 72 sata nakon tretmana. Na ordinati je označen postotak vijabilnih stanica. PL (sivo) označava parentalnu liniju, RL (plavo) uspostavljenu rezistentnu staničnu liniju, a RL 2TJ NT (narančasto) rezistentnu staničnu liniju koja nije tretirana u periodu od dva tjedna.

#### 4.5.2 Morfologija rezistentnih staničnih linija

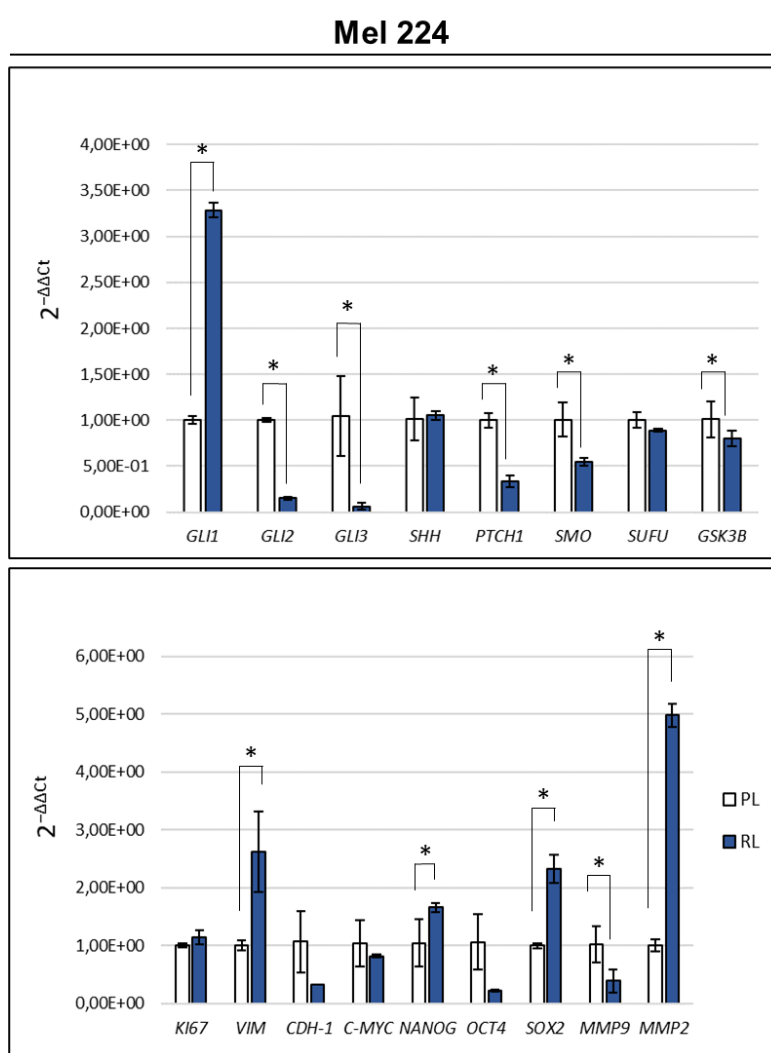
Tijekom uspostave rezistentnih staničnih linija došlo je do vidljive promjene morfologije stanica. Iz tog razloga su stanične linije fotografirane te je uspoređena morfologija stanica s ishodišnim parentalnim linijama (Slika 4.24). Rezistentne stanice su mnogo veće i izduženije, odnosno morfologija im nalikuje mezenhimalnim stanicama. U slučaju ishodišnih parentalnih linija, stanice su manje i imaju pločasti oblik koji nalikuje epitelnim stanicama. Promjene u morfologiji rezistentnih staničnih linija ukazuju na to da je vrlo vjerojatno tijekom uspostave rezistencije došlo do procesa epitelno-mezenihmalne tranzicije ili je taj proces dodatno induciran uslijed razvoja iste (271). Iz toga razloga su biljezi epitelno-mezenihmalne tranzicije uvršteni u panel za karakterizaciju uspostavljenih staničnih linija na genskoj i proteinskoj razini.



**Slika 4.24.** Morfologija uspostavljenih staničnih linija Mel 224 i CHL-1 rezistentnih na GANT61. Vidljiva je promjena u morfologiji rezistentnih staničnih linija u vidu poprimanja fenotipa mezenhimalnih stanica. PL označava ishodišne parentalne linije, a RL uspostavljene rezistentne stanične linije.

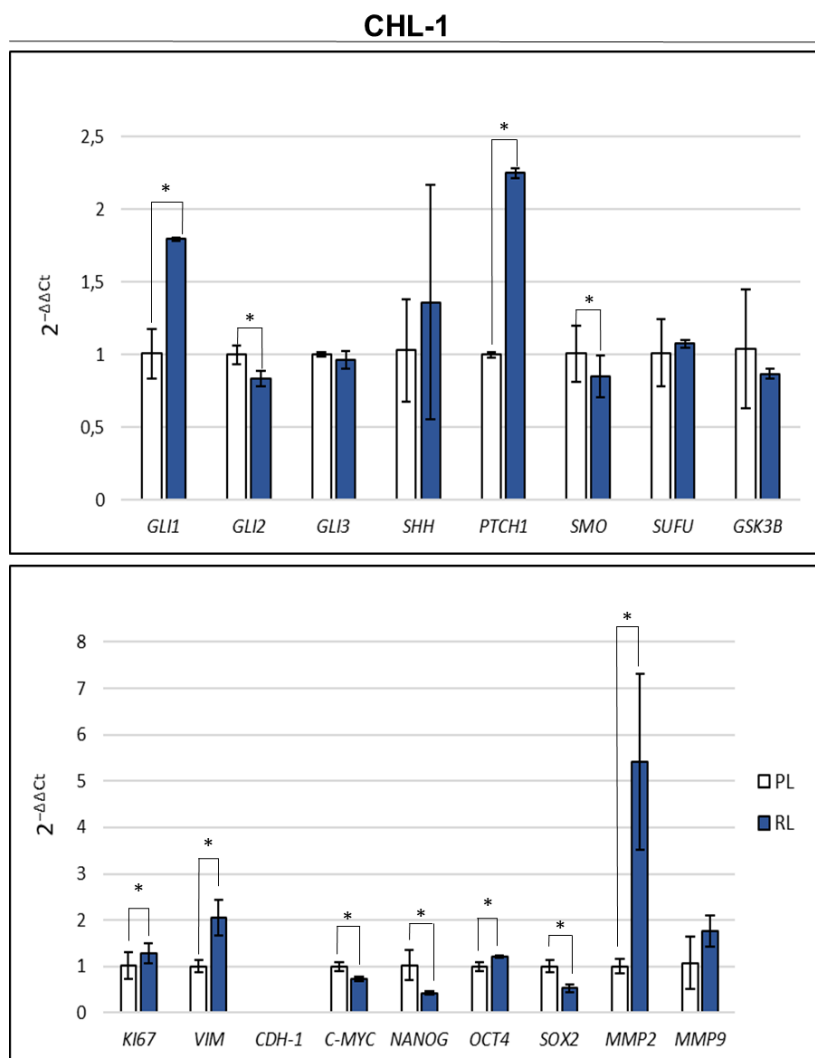
### 4.5.3 Profil genske ekspresije u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama

Nakon što su rezistentne stanične linije na GANT61 uspješno uspostavljene i validirane, analizirana je genska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI: *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1*, *SMO*, *SUFU* i *GSK3-β*, biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije E-kadherin (*CDH1*), vimentin (*VIM*), biljega invazivnosti *MMP9* i *MMP2*, proliferacijskih biljega *Ki67* i *C-MYC* te biljega matičnih stanica *NANOG*, *OCT4* i *SOX2*. Kod stanične linije Mel 224 s mutacijom *NRAS*, vidljiva je snižena genska ekspresija većine komponenti signalnog puta HH-GLI, povećanje razine *VIM* i *MMP9*, biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije te biljega matičnih stanica *SOX2*, dok je ekspresija epitelnog biljega *CDH-1* snižena (Slika 4.25).



**Slika 4.25.** Razina genske ekspresije komponenti signalnog puta HH-GLI, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1*, *SUFU*, *SMO* i *GSK3-β*, biljega proliferacije, EMT-a te matičnih stanica u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 (RL) i njejoj parentalnoj liniji (PL). Na apscisi su prikazani analizirani geni, a na ordinati izražena razina ekspresije normalizirana prema kontrolnoj parentalnoj liniji u obliku vrijednosti  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Zvezdicom \* su označene statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ).

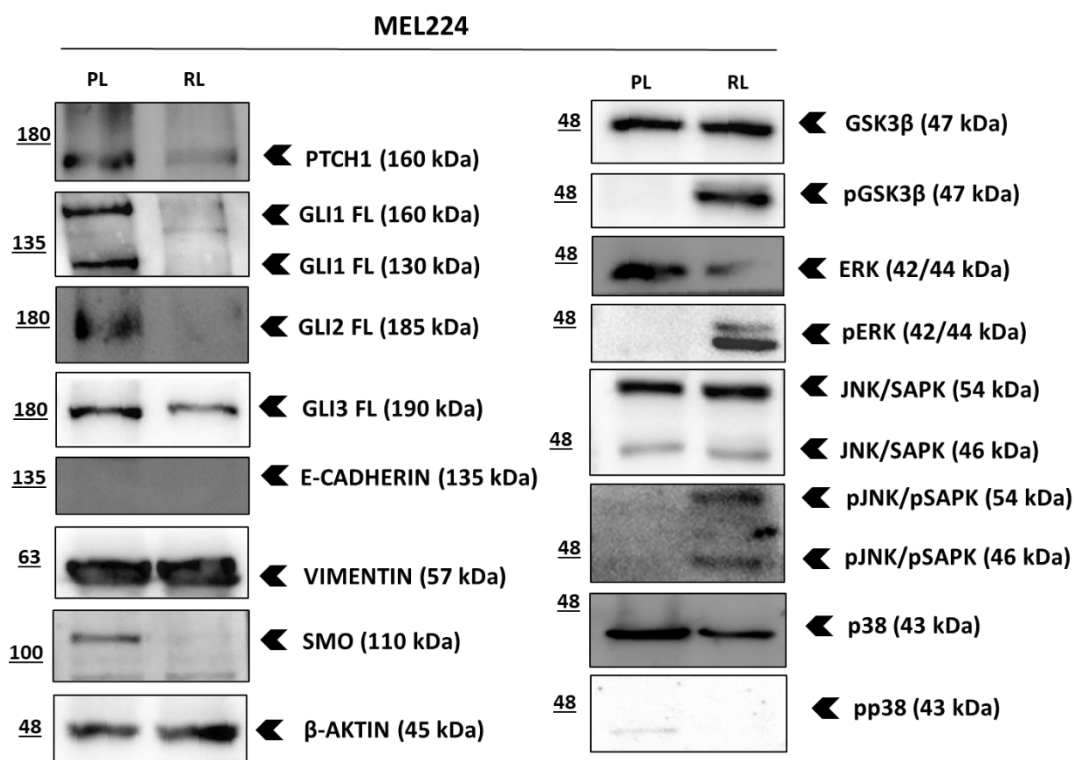
Rezistentna stanična linija divljeg tipa, CHL-1 pokazuje povišenu razinu gena *GLI1* i *PTCH1*, dok su ostale komponente HH-GLI u razini genske ekspresije parentalne linije. Genska razina biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije *VIM* te *MMP2* također je povišena u odnosu na kontrolnu liniju, a ekspresiju epitelnog biljega *CDH-1* nije bilo moguće detektirati (Slika 4.26).



**Slika 4.26.** Razina genske ekspresije komponenti signalnog puta HH-GLI, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1*, *SUFU*, *SMO* i *GSK3-β*, biljega proliferacije, EMT-a te matičnih stanica u GANT61 rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1 (RL) i njejoj parentalnoj liniji (PL). Na apscisi su prikazani analizirani geni, a na ordinati izražena razina ekspresije normalizirana prema kontrolnoj parentalnoj liniji u obliku vrijednosti  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Zvezdicom \* su označene statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.4 Analiza profila ekspresije proteina u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama

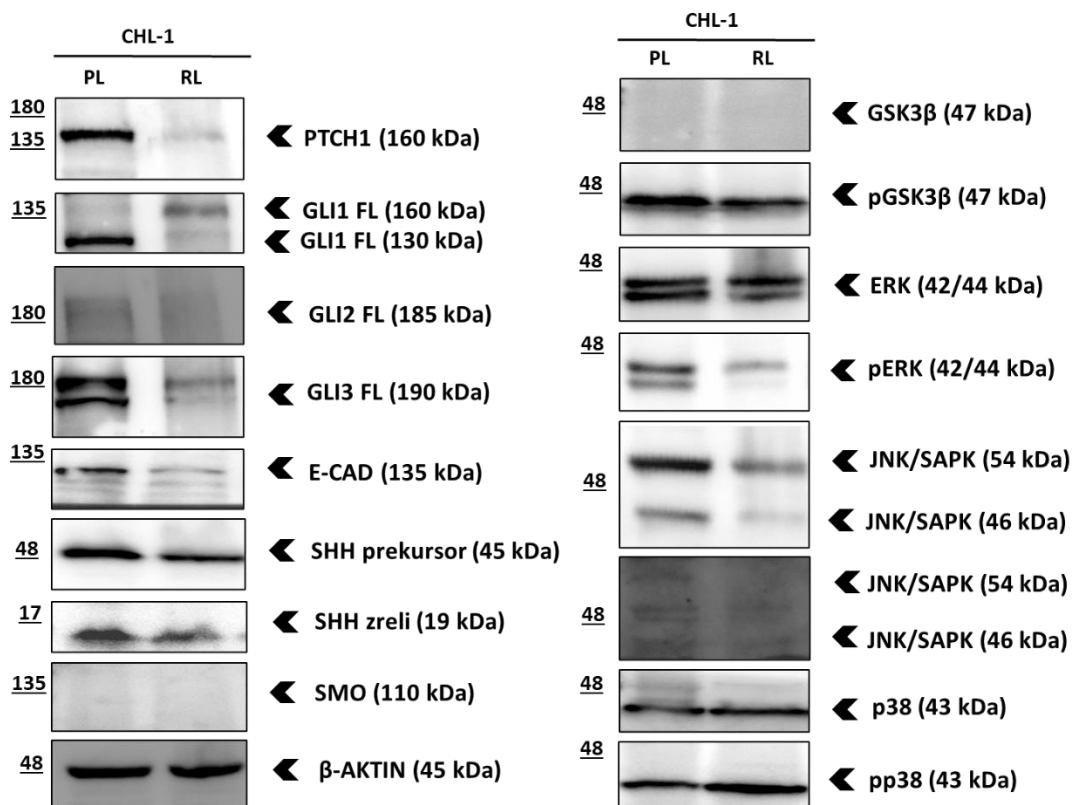
Osim genske ekspresije, analizirana je i proteinska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI: GLI1, GLI2, GLI3, PTCH1, SMO i GSK3- $\beta$ , komponenti signalnog puta RAS/RAF/MAPK: ERK, JNK, p38 te njihovih aktivnih fosforiliranih formi i biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije, E-kadherina i vimentina.  $\beta$ -aktin korišten je kao kontrola volumena za nanošenje proteina. Kod rezistentne stanične linije Mel 224, vidljiva je snižena ekspresija proteina signalnog puta HH-GLI, PTCH1, GLI1, GLI2, GLI3 i SMO. Zanimljivo, komponente signalnog puta RAS/RAF/MAPK, ERK i JNK pojačano su ekspimirane u aktivnom fosforiliranom obliku. Od komponenti HH-GLI, jedino kinaza GSK3- $\beta$  u fosforiliranom obliku ima jaču ekspresiju u rezistentnoj staničnoj liniji u odnosu na kontrolnu parentalnu liniju (Slika 4.27).



**Slika 4.27** Proteinska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i RAS/RAF/MAPK te biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224.  $\beta$ -aktin korišten je kao kontrola za nanošenje proteina. PL označava kontrolnu parentalnu liniju, a RL rezistentnu staničnu liniju. FL označava formu proteina GLI pune duljine (eng. *full length*).



Kod rezistentne stanične linije CHL-1 također je proteinska ekspresija nekih komponenata signalnog puta HH-GLI promijenjena. PTCH1, GLI2, GLI3 i pGSK3- $\beta$  pokazuju sniženu ekspresiju u odnosu na kontrolnu liniju. Detektirane su dvije forme proteina GLI1, jedna na 160 kDa te druga na 130 kDa. Forma od 160 kDa isključivo je prisutna u rezistentnoj staničnoj liniji, dok je forma od 130 kDa jače eksprimirana u kontrolnoj liniji. Epitelni marker E-kadherin također je smanjen u rezistentnoj staničnoj liniji. Za razliku od rezistentne stanične linije Mel 224 s mutacijom *NRAS*, CHL-1 pokazuje smanjenu ekspresiju komponenti signalnog puta RAS/RAF/MAPK, pERK i pJNK, dok je signalni krak p38 jače eksprimiran (Slika 4.28).



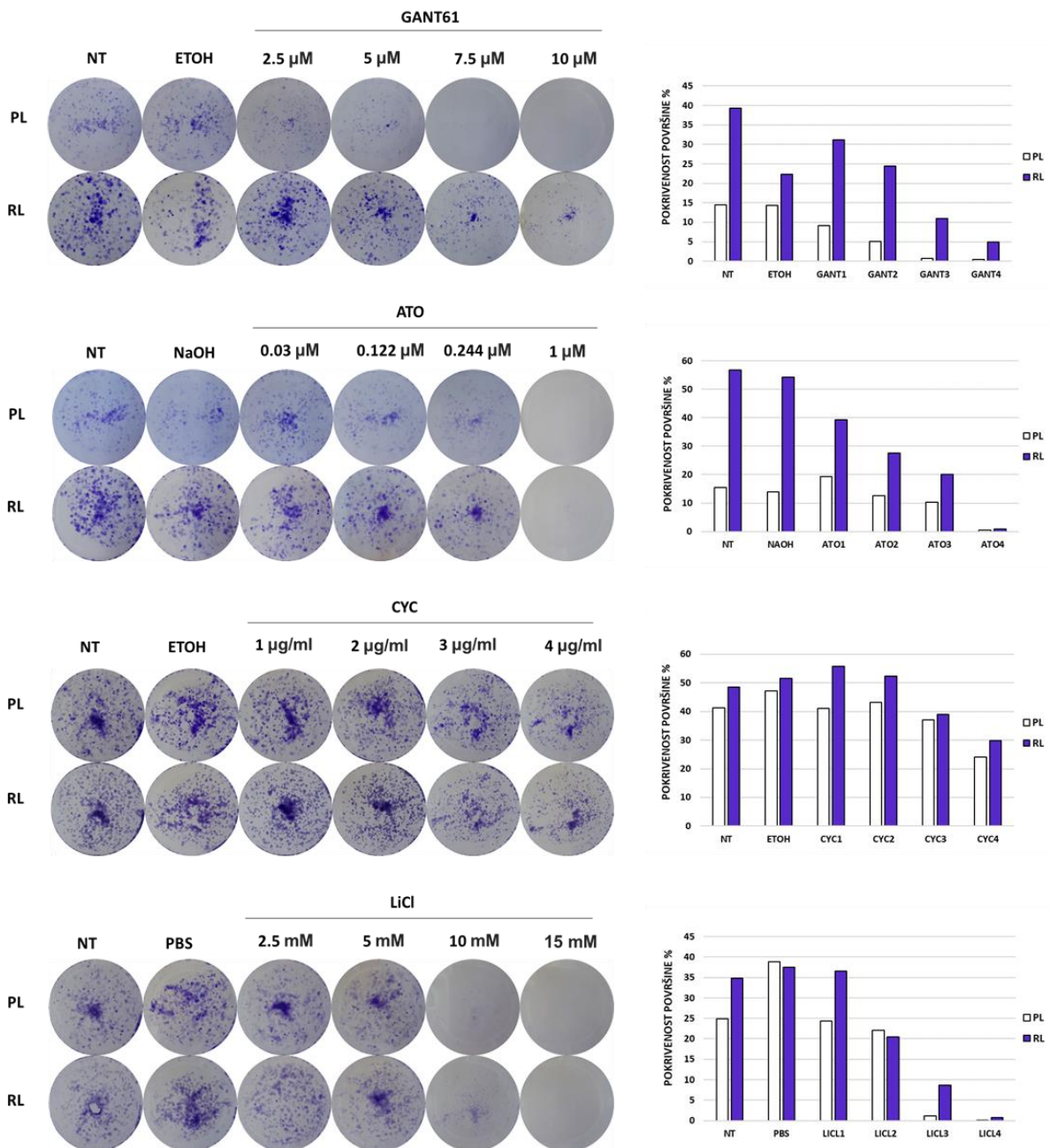
**Slika 4.28.** Proteinska ekspresija komponenti signalnog puta HH-GLI i RAS/RAF/MAPK te biljega epitelno-mezenhimalne tranzicije u rezistentnoj staničnoj liniji divljeg tipa CHL-1.  $\beta$ -aktin korišten je kao kontrola volumena za nanošenje proteina. PL označava kontrolnu parentalnu liniju, a RL rezistentnu staničnu liniju. FL označava formu proteina GLI pune duljine (eng. *full length*).

#### 4.5.5 Sposobnost formiranja kolonija u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama

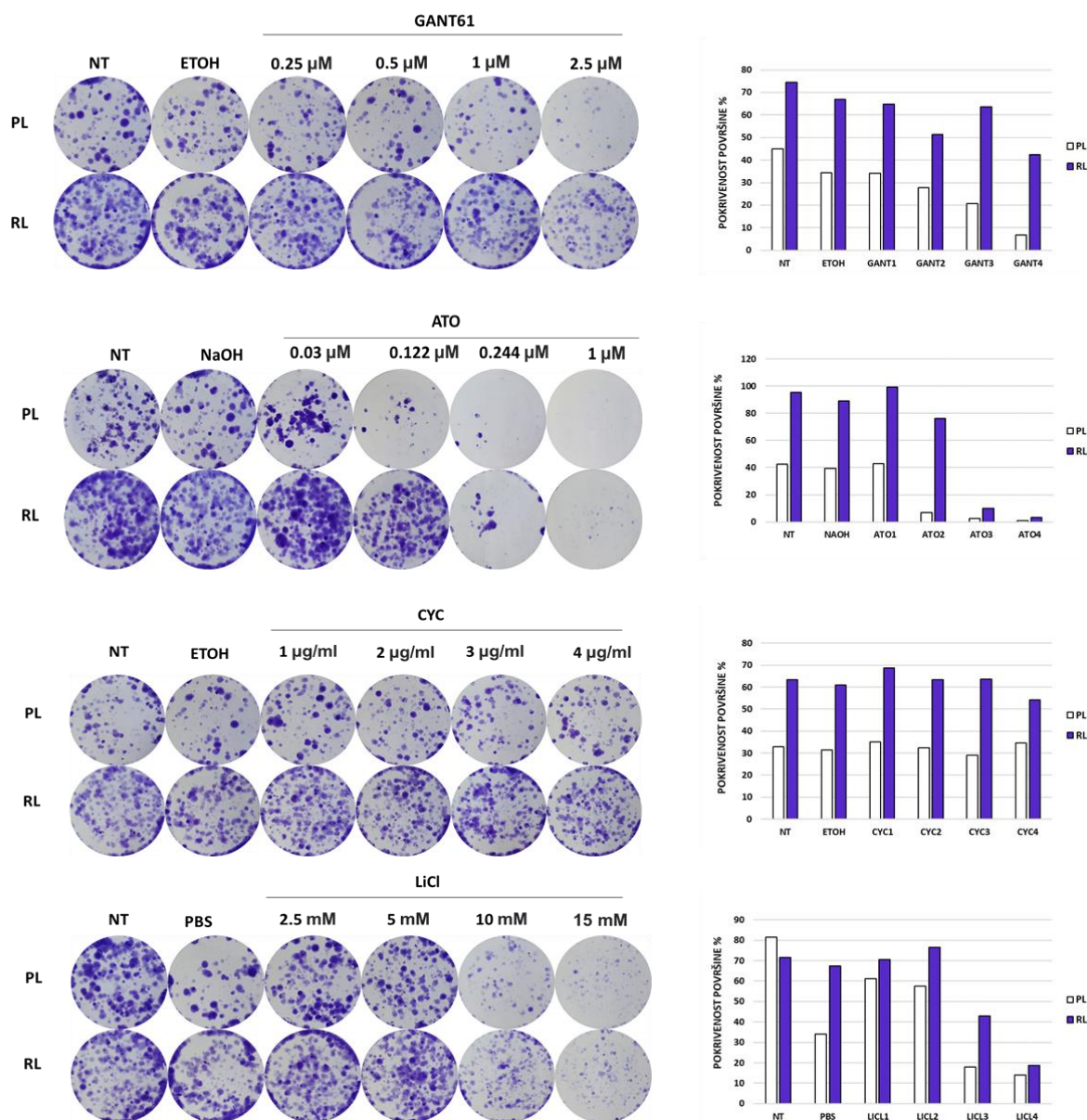
Kako bi se ispitalo utječe li stjecanje rezistencije na sposobnost formiranja kolonija te na koji način, korištena je metoda klonalnog rasta stanica (eng. *Colony forming assay*). Kod stanične linije Mel 224 s mutacijom *NRAS* vidi se povećani potencijal za formiranje kolonija kod rezistentne linije u odnosu na kontrolnu liniju unatoč povećanju koncentracija GANT61. Kontrolna linija Mel 224 na 5  $\mu\text{M}$  GANT61 stvara jako mali broj kolonija, dok rezistentna linija ima vidljive kolonije i pri najvećoj koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$ . Kod tretmana arsenovim trioksidom (ATO) rezistentna stanična linija formira veći broj kolonija u odnosu na kontrolnu liniju, ali pri najvećoj koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  obje linije gube sposobnost formiranja kolonija. Ciklopamin (CYC) pokazuje najslabiji učinak te se vidi da stanice imaju sposobnost formiranja kolonija u cijelom rasponu koncentracija. Litijev klorid (LiCl) dokida formiranje kolonija u kontrolnoj liniji pri koncentraciji od 10 mM, dok rezistentna linija pri toj dozi još uvijek formira kolonije. Svi tretmani, GANT61 ( $r=-0,7246$ ,  $p=0,0420$ ), ATO ( $r=-0,8371$ ,  $p=0,0095$ ), CYC ( $r=-0,9187$ ,  $p=0,0013$ ) i LiCl ( $r=-0,769$ ,  $p=0,0257$ ) pokazuju efekt ovisan o dozi te dovode do smanjene sposobnosti formiranja kolonija povećanjem koncentracije spoja. Zanimljivo, unatoč tome što je svuda nasaden jednak broj stanica, inicijalno rezistentna stanična linija formira veći broj kolonija (Slika 4.29).

Za razliku od stanične linije Mel 224 s mutacijom u genu *NRAS*, stanična linija divljeg tipa, CHL-1 stvara kolonije koje su potpuno morfološki drugačije (Slika 4.30). Dok su kolonije kod Mel 224 sitne, u staničnoj liniji CHL-1 kolonije su mnogo veće i pravilnog okruglog oblika. Iako bi se vizualnom analizom zaključilo da obje linije CHL-1 reagiraju na tretmane GANT61, arsenovog trioksida (ATO) i litijevog klorida (LiCl) tako da s povećanjem doze tretmana broj kolonija opada, jedino tretman LiCl ima zadovoljavajući koeficijent korelacije ( $r=-0,8645$ ,  $p=0,0056$ ). Tretman ciklopaminom (CYC), kao i u slučaju stanične linije Mel 224, gotovo da nema utjecaj na sposobnost formiranja kolonija. Stanična linija rezistentna na GANT61 pokazuje jači potencijal formiranja kolonija u odnosu na kontrolu. Dok kod kontrolne linije gotovo nema vidljivih kolonija na koncentraciji 2,5  $\mu\text{M}$  GANT61, rezistentna stanična linija i dalje formira veliki broj kolonija. Slična situacija je kod tretmana arsenovim trioksidom. Iako koncentracija od 0,244  $\mu\text{M}$  smanjuje sposobnost formiranja kolonija u obje linije, na manjoj koncentraciji od 0,122  $\mu\text{M}$  rezistentna stanična linija formira velik broj kolonija za razliku od kontrolne linije. Litijev klorid pravilno dokida sposobnost formiranja kolonija, no kod rezistentne linije broj kolonija je veći. Kao i kod stanične linije Mel 224, kod rezistentne linije CHL-1 izgleda kao da stanice inicijalno stvaraju veći broj kolonija u odnosu na kontrolu.

## Mel 224



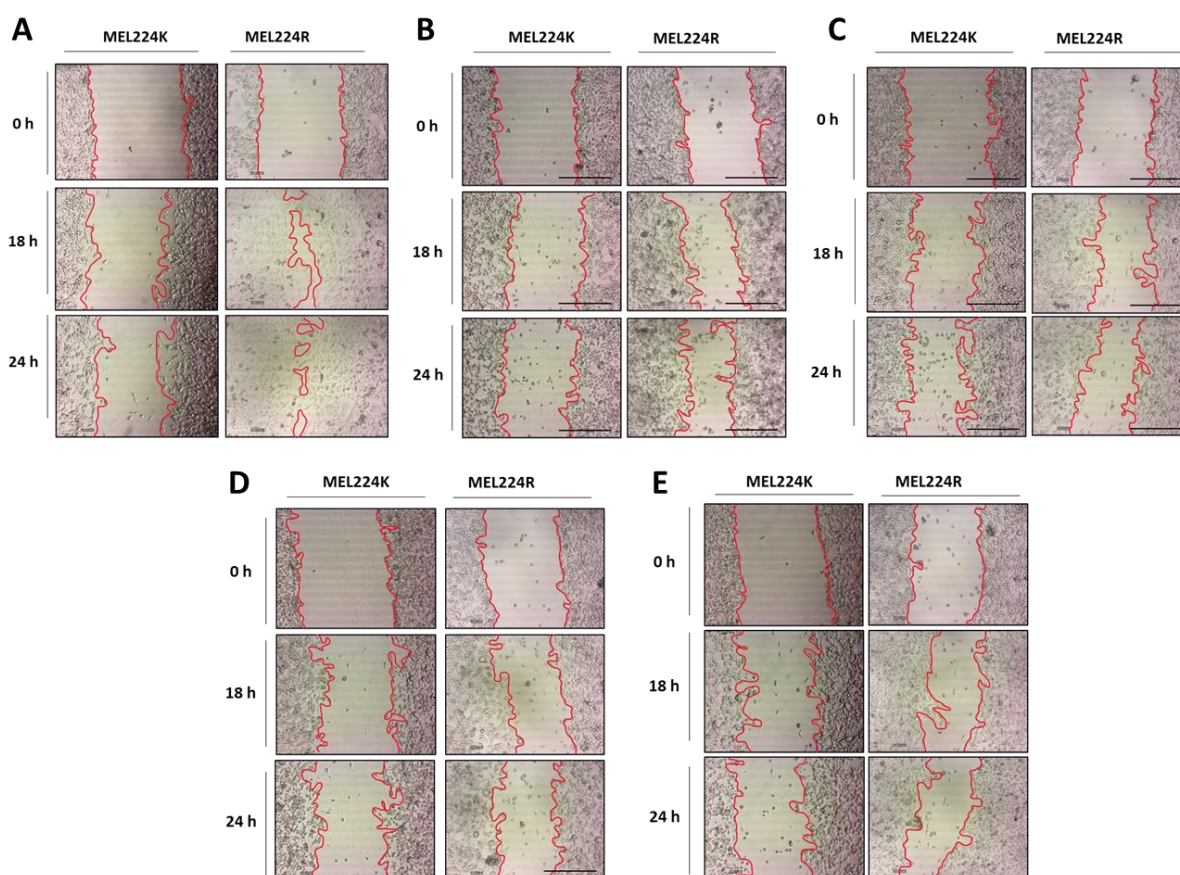
**Slika 4.29.** Utjecaj kemijskih spojeva GANT61, arsenovog trioksida (ATO), ciklopamina (CYC) i litijevog klorida (LiCl) na sposobnost formiranja kolonija u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 (RL) i njejoj parentalnoj liniji (PL). NT označava netretirane stanice, dok drugi stupac označava kontrolu otapala (ETOH - etanol, NaOH - natrij hidroksid, PBS).



**Slika 4.30.** Utjecaj kemijskih spojeva GANT61, arsenovog trioksida (ATO), ciklopamina (CYC) i litijevog klorida (LiCl) na sposobnost formiranja kolonija u rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1 (RL) te njenoj kontroli (PL). NT označava netretirane stanice, dok drugi stupac označava kontrolu otapala (ETOH - etanol, NaOH - natrij hidroksid, PBS).

#### 4.5.6 Sposobnost migriranja u rezistentnim staničnim linijama

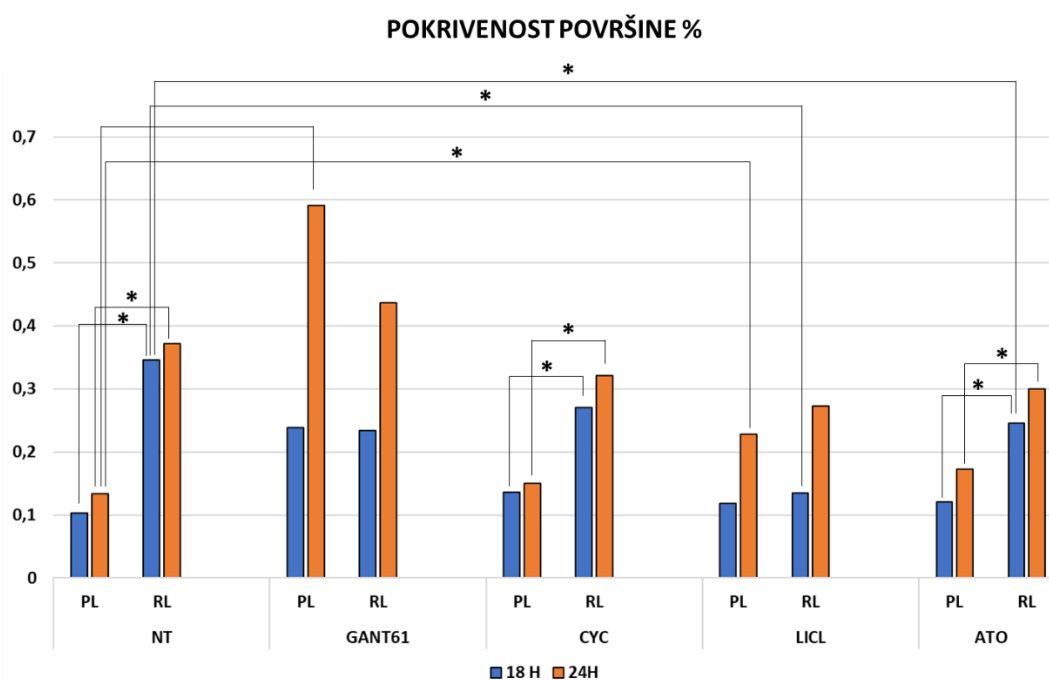
Kako bi se ispitala migracijska sposobnost stanica, korišten je test zatvaranja ureza (eng. "Wound healing assay"). Kod stanične linije Mel 224 vidljive su razlike u migracijskoj sposobnosti između rezistentne stanične linije i njene kontrole. Iako svi spojevi u konačnici onemogućavaju popunjavanje ureza unutar analizirana 24 sata, vizualnom analizom vidljivo je da kontrolna linija pokazuje manju migracijsku sposobnost u odnosu na rezistentnu liniju u svakom od promatranih uvjeta, u uvjetima bez tretmana te u prisutnosti GANT61, ATO, CYC i LiCl (Slika 4.31). Najveća razlika u migracijskom potencijalu vidljiva je u netretiranim uvjetima gdje rezistentna stanična linija unutar 24 sata gotovo u potpunosti popuni napravljeni urez.



**Slika 4.31.** Vizualno praćenje utjecaja kemijskih spojeva na migracijsku sposobnost jednog seta uzoraka rezistentne stanične linije Mel 224 (R) i njene kontrole (K). A) netretirane stanice B) tretman 10  $\mu\text{M}$  GANT61 C) tretman 0,5  $\mu\text{M}$  arsenov trioksid D) tretman 1  $\mu\text{g/ml}$  ciklopamin E) tretman 20 mM litijev klorid. Migracijska sposobnost analizirana je na dan tretmana 0.dan, 18 i 24 sata nakon tretmana.

Kvantifikacijom rezultata potvrđeno je da rezistentna stanična linija ima veći migracijski potencijal u odnosu na parentalnu liniju u oba vremenska intervala u uvjetima bez tretmana (18h  $p=0,0001$ ; 24h  $p=0,0003$ ) te prisutnosti ATO (18h  $p=0,0001$ ; 24h  $p=0,0001$ ) i CYC (18h  $p=0,0071$ ; 24h  $p=0,0012$ ) (Slika 4.32). U tretmanima GANT61 te LiCl nisu opažene statistički značajne razlike između parentalne i rezistentne linije.

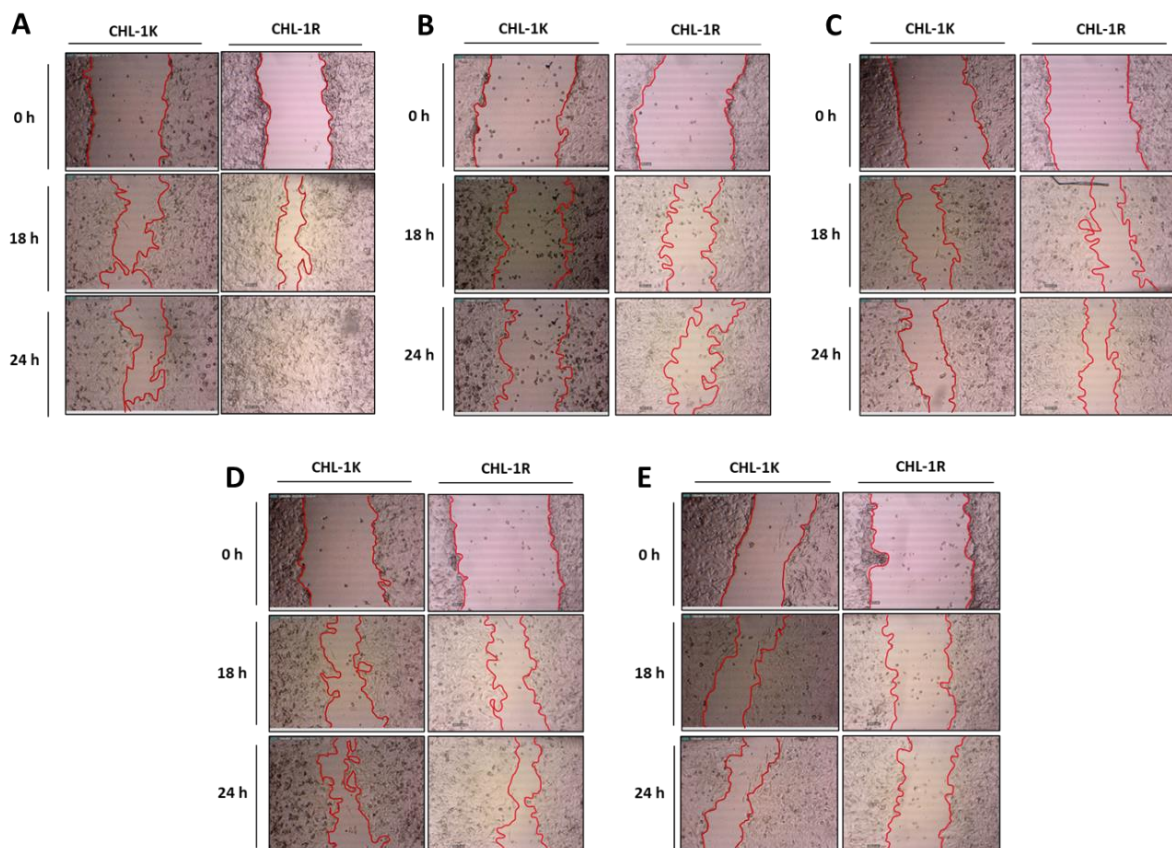
Zanimljivo, kvantifikacijom je ustanovljen suprotan trend 24 sata nakon tretmana GANT61. Obje linije pokazuju povećani migracijski potencijal u odnosu na uvjete bez tretmana, no jedino se u slučaju parentalne linije opaža statistički značajni učinak ( $p=0,0002$ ). Povećani migracijski potencijal uslijed tretmana GANT61 predstavlja neočekivani ishod, ali trend koji je već prethodno opažen i na drugim staničnim modelima s kojima laboratorij ima iskustva (239). Usporedbom pojedinačnih tretmana s uvjetima bez tretmana, vidljivo je da je u uvjetima s tretmanom ATO i LiCl migracijska sposobnost rezistentne linije smanjena (ATO  $p=0,0306$ ; LiCl  $p=0,0012$ ). Suprotno tome, kontrolna stanična linija pokazuje statistički značajnu osjetljivost isključivo na tretman LiCl ( $p=0,0414$ ). Učinak ostalih spojeva nije se pokazao statistički značajan u odnosu na uvjete bez tretmana.



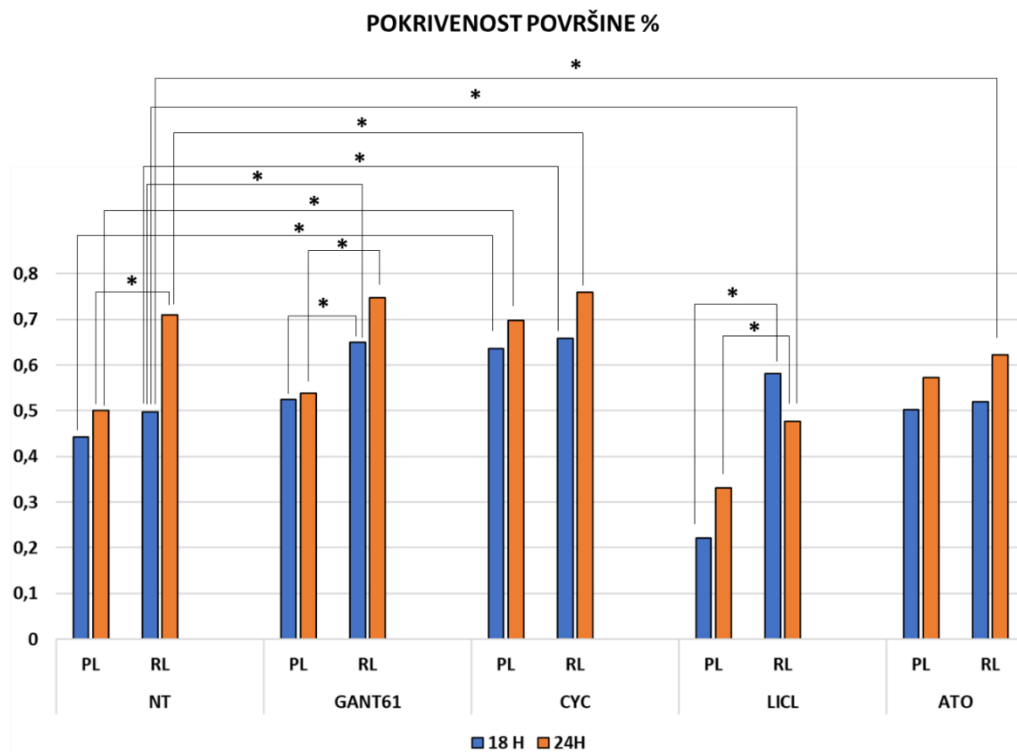
**Slika 4.32** Kvantifikacija migracijske sposobnosti rezistentne stanične linije Mel 224 i njene kontrole. Na apscisi su označeni parovi uzoraka i pojedini uvjeti NT- netretirano, 10  $\mu$ M GANT61, 1  $\mu$ g/ml ciklopamin (CYC), 20 mM litijev klorid (LiCl) te 0,5  $\mu$ M arsenov trioksid (ATO). Na ordinati je označen postotak pokrivenosti ureza nakon 18 (plavo) i 24 (narančasto) sata. PL označava kontrolnu parentalnu liniju, a RL rezistentnu staničnu liniju. Kvantifikacija je napravljena na temelju dvije biološke replike i 8 tehničkih replikata. Zvezdicom (\*) su označene statistički značajne vrijednosti ( $p<0,05$ ).

U staničnoj liniji divljeg tipa, CHL-1 također su vidljive razlike između rezistentne i kontrolne linije u migracijskom potencijalu stanica (Slika 4.33). Vizualnom analizom vidljivo je da u svim ispitanim uvjetima rezistentna stanična linija ima veći migracijski potencijal u odnosu na kontrolnu liniju. Dok u uvjetima bez tretmana rezistentna linija u potpunosti popuni napravljeni urez nakon 24 sata, dodatkom tretmana migracijska se sposobnost donekle smanjuje. Kvantifikacijom vizualnih rezultata, određeni trendovi su potvrđeni te je vidljivo da u uvjetima

bez tretmana (24h  $p=0,0027$ ) te prisutnosti GANT61 (18h  $p=0,0215$ , 24h  $p=0,0048$ ) i LiCl (18h  $P<0,0001$ ; 24h  $p=0,0134$ ) rezistentna stanična linija ima jaču migracijsku sposobnost od parentalne linije (Slika 4.34). Tretman GANT61 i CYC čak pokazuju suprotan stimulatívni efekt na migracijsku sposobnost. U slučaju parentalne linije, u odnosu na uvjete bez tretmana, tretmani CYC (18h  $p=0,0065$ ; 24h  $p=0,0129$ ) i LiCl (18h  $p=0,0005$ ; 24h  $p=0,0179$ ) su se pokazali statistički značajni. U rezistentnoj staničnoj liniji, tretmani GANT61 (18h  $p=0,0028$ ), CYC (18h  $p=0,0024$  ; 24h  $p=0,0430$ ), LiCl (24h  $p=0,0001$ ) te ATO (24h  $p=0,0196$ ) su se pokazali značajni u odnosu na uvjete bez tretmana.



**Slika 4.33** Vizualno praćenje utjecaja kemijskih spojeva na migracijsku sposobnost jednog seta uzoraka rezistentne stanične linije CHL-1 (R) i njene kontrole (K). A) netretirane stanice B) tretman 10 mM GANT61 C) tretman 0,5  $\mu\text{M}$  arsenov trioksid D) tretman 1  $\mu\text{g/ml}$  ciklopamin E) tretman 20 mM litijev klorid. Migracijska sposobnost analizirana je na dan tretmana 0.dan, 18 i 24 sata nakon tretmana.

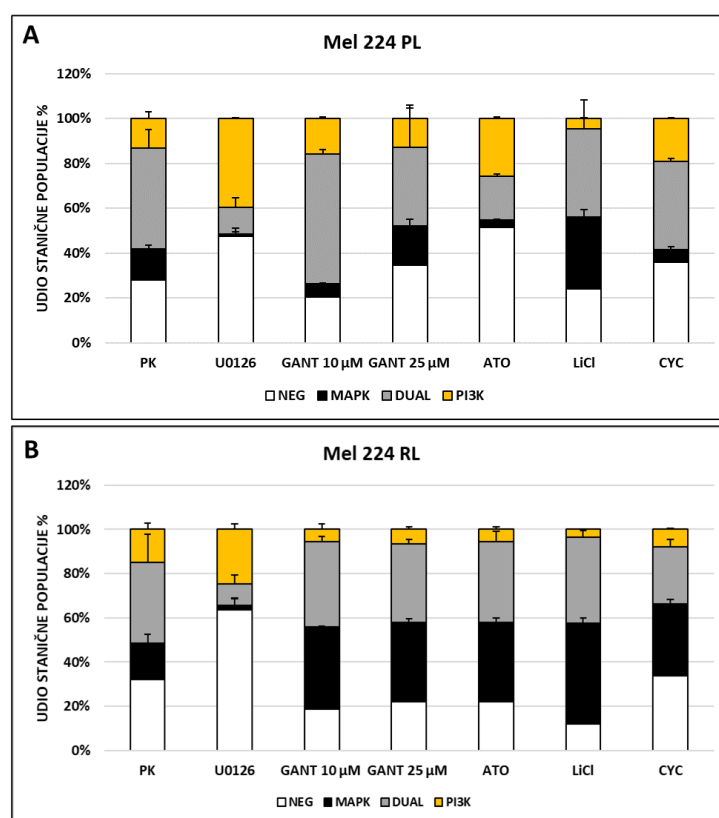


**Slika 4.34.** Kvantifikacija migracijske sposobnosti rezistentne stanične linije CHL-1 i njene kontrole. Na apscisi su označeni parovi uzoraka i pojedini uvjeti NT-netretirano, 10  $\mu$ M GANT61, 1  $\mu$ g/ml ciklopamin (CYC), 20 mM litijev klorid (LiCl) te 0,5  $\mu$ M arsenov trioksid (ATO). Na ordinati je označen postotak pokrivenosti ureza nakon 18 i 24 sata. PL označava kontrolnu parentalnu liniju, a RL rezistentnu staničnu liniju. Kvantifikacija je napravljena na temelju dvije biološke replike i 8 tehničkih replikata. Zvezdicom (\*) su označene statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ).



#### 4.5.7 Analiza aktivnosti signalnog puta RAS/RAF/MAPK u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama

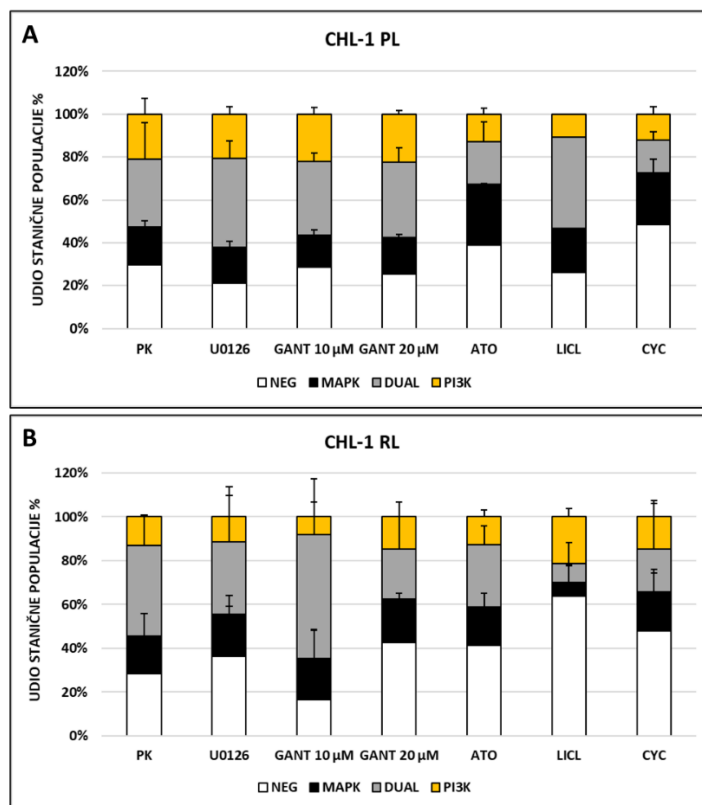
Kako bi se analizirala aktivnost signalnog puta MAPK/PI3K, stanice su uzgajane u različitim uvjetima: tretman 0,01 mM inzulinom (aktivator RAS/RAF/MAPK kojim se osigurava detektabilna bazalna aktivnost signalnog puta), tretman 0,01 mM U0126 (inhibitor MEK1/2 koji služi kao negativna kontrola) te tretmani inhibitorima HH-GLI (GANT61, ATO, LiCl i CYC).



**Slika 4.35.** Analiza aktivnosti signalnog puta MAPK/PI3K u kontrolnoj (A) i rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 (B). Na apscisi su označeni tretmani, a na ordinati udio stanične populacije (%) s ne/aktivnim signalnim putem MAPK/PI3K. PK označava tretman 0,01 mM inzulinom, NK tretman 0,01 mM U0126, GANT10 i GANT25 istoimene tretmane u μM, 15 μM ATO, 20 mM LiCl te 1 μg/ml CYC. Bijelo – stanice s neaktivnim MAPK/PI3K, crno – aktivni MAPK, sivo – dvojna aktivacija MAPK/PI3K, žuto – aktivni PI3K.

Parentalna i rezistentna stanična linija Mel 224 pokazuju sličnu bazalnu aktivnost MAPK/PI3K (crni, sivi i žuti segmenti grafa) (Slika 4.35). Tretman inhibitorom MEK1/2 U0126, uzrokuje u rezistentnoj liniji statistički značajno povećanje udjela negativnih stanica ( $p=0,0072$ ) u odnosu na parentalnu liniju. U odnosu na parentalnu liniju, tretmani inhibitorima HH-GLI, GANT61, ATO i LiCl u rezistentnoj liniji uzrokuju statistički značajno povećanje udjela stanica s aktivnim signalnim putem MAPK/PI3K (GANT61  $p=0,0010$ ; ATO  $p=0,0079$ ; LiCl  $p=0,0008$ ). Suprotno tome, u kontrolnoj liniji inhibitori HH-GLI, GANT61 i ATO uzrokuju dodatno povećanje udjela

stanica s negativnim signalnim putem. Zanimljivo, u rezistentnoj staničnoj liniji tretman inhibitorima GANT61, ATO i LiCl ima značajan učinak na povećanje udjela populacije stanica s aktivnim signalnim putem u odnosu na tretman inzulinom koji predstavlja bazalne uvjete (GANT61  $p=0,0395$ ; ATO  $p=0,0354$ ; LiCl  $p=0,0026$ ). Neovisno o tretmanu, aktivacija je najčešće dvojne prirode, odnosno najčešće se aktiviraju oba signalna puta, MAPK i PI3K, što ne iznenađuje s obzirom na poznatu međuovisnost navedenih signalnih puteva.



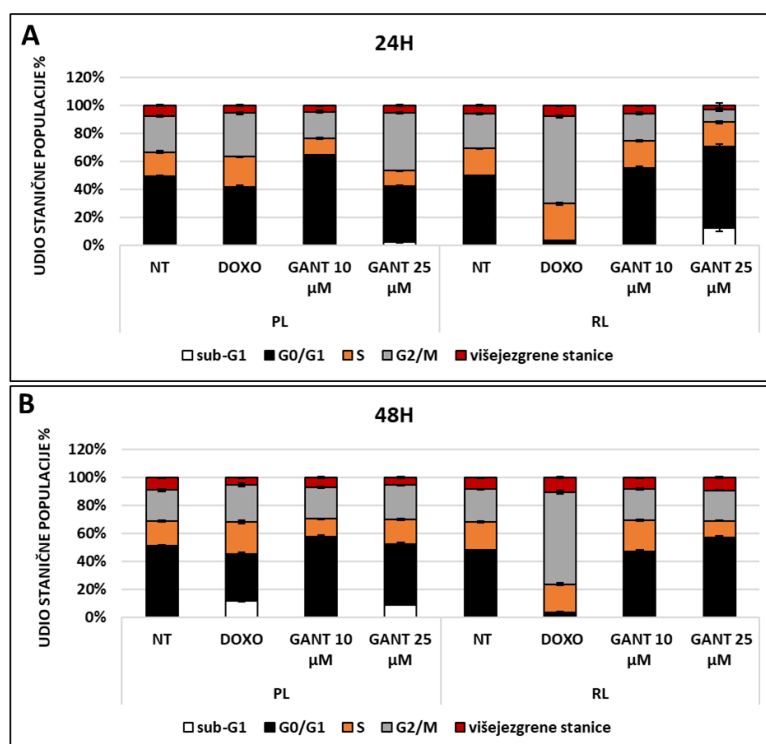
**Slika 4.36.** Analiza aktivnosti signalnog puta MAPK/PI3K u kontrolnoj (A) i rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1 (B). Na apscisi su označeni tretmani, a na ordinati udio stanične populacije (%) s ne/aktivnim signalnim putem MAPK/PI3K. PK označava tretman 0,01 mM inzulinom, NK tretman 0,01 mM U0126, GANT10 i GANT25 istoimene tretmane u  $\mu$ M, 15  $\mu$ M ATO, 20 mM LiCl te 1  $\mu$ g/ml CYC. Bijelo – stanice s neaktivnim MAPK/PI3K, crno – aktivni MAPK, sivo – dvojna aktivacija MAPK/PI3K, žuto – aktivni PI3K.

Kod stanične linije divljeg tipa, CHL-1 profili aktivnosti MAPK/PI3K izgledaju sličnije u odnosu na staničnu liniju Mel 224 (Slika 4.36). Kod obje linije, parentalnoj i rezistentnoj, u bazalnim uvjetima (PK) može se vidjeti da aktivnost signalnog puta iznosi oko 30 % što predstavlja podjednak udio stanične populacije onome koji je detektiran kod stanične linije Mel 224. U parentalnoj staničnoj liniji CHL-1 tretmani inhibitorima ATO i CYC uzrokuju smanjenje udjela stanične populacije s aktivnim signalnim putem, dok ostali tretmani ne djeluju značajno na parentalnu liniju. S druge strane, u rezistentnoj liniji svi inhibitori HH-Gli smanjuju udio stanica

s aktivnim signalnim putem, no polučeni efekt nije statistički značajan. Kod međusobne usporedbe linija, osobito se ističe tretman LiCl koji u rezistentnoj staničnoj liniji dovodi do statistički značajnog povećanja udjela populacije s negativnim signalnim putem MAPK/PI3K u odnosu na parentalnu liniju ( $p=0,0394$ ). Suprotno tome, tretman  $10 \mu\text{M}$  GANT61 dovodi do smanjenja populacije s negativnim signalnim putem u odnosu na parentalnu liniju ( $p=0,0304$ ). Kao i u slučaju stanične linije Mel 224, aktivacija signalnih puteva je najčešće dvojne prirode.

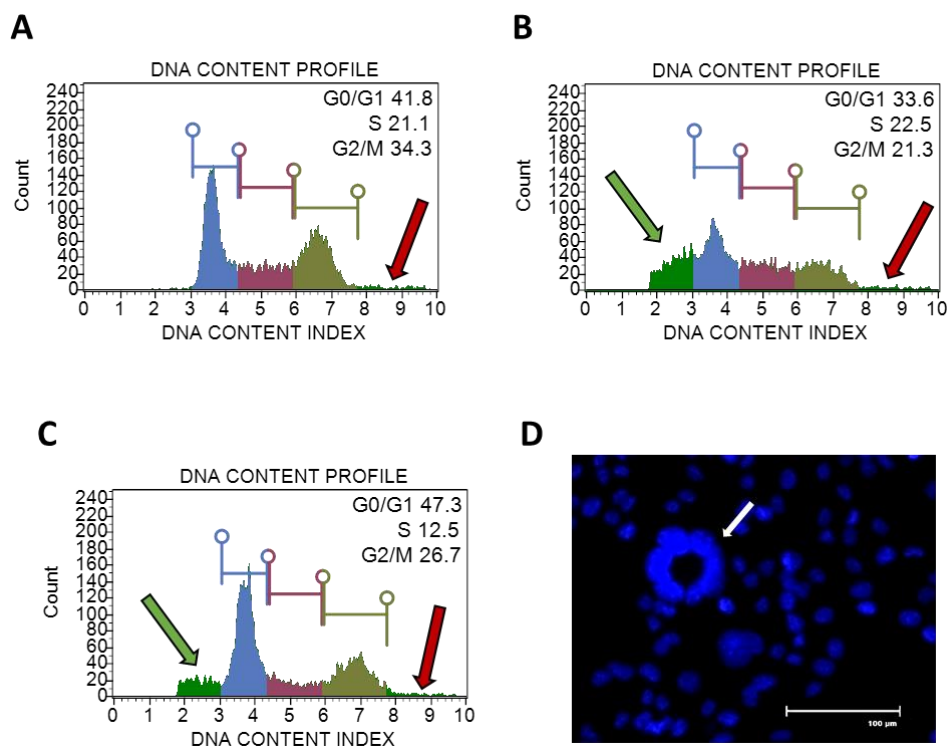
#### 4.5.8 Analiza staničnog ciklusa u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama

Kako bi se analizirao stanični ciklus uspostavljenih staničnih linija, stanice su uzgajane u nekoliko uvjeta: uvjeti bez tretmana, tretman  $100 \text{ nM}$  doksorubicinom (DOXO) koji je poznati blokator faza G2/M, te tretmani GANT61 u dozama LD50 ( $10 \mu\text{M}$ ) i dozi u kojoj rezistentne stanične linije normalno preživljavaju, u slučaju Mel 224  $25 \mu\text{M}$  GANT61, a kod CHL-1  $20 \mu\text{M}$  GANT61.



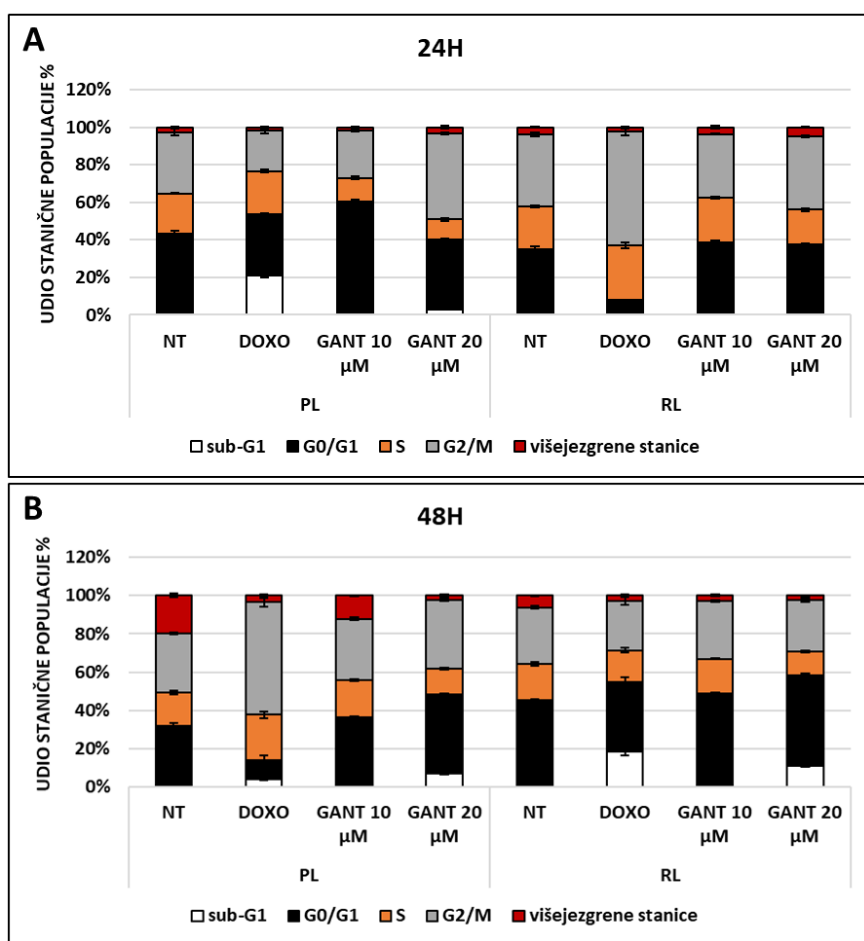
**Slika 4.37.** Analiza staničnog ciklusa u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224. A) Analiza staničnog ciklusa 24 sata nakon tretmana. B) Analiza staničnog ciklusa 48 sati nakon tretmana. Na apscisi se označeni pojedini tretmani, a na ordinati postotak stanica u fazama staničnog ciklusa sub-G1 (bijelo), G0/G1 (crno), S (narančasto) i G2/M (sivo) te polinuklearne stanice (crveno). PL označava kontrolnu parentalnu liniju, a RL rezistentnu staničnu liniju. NT označava netretirane uzorke, DOXO tretman  $100 \text{ nM}$  doksorubicinom, a GANT61 10 i 25 istoimene tretmane u koncentracijama  $\mu\text{M}$ .

Rezistentna stanična linija Mel 224 u uvjetima bez tretmana ima profil staničnog ciklusa veoma sličan onome kod kontrolne linije neovisno o vremenskoj točki (Slika 4.37). Tretman DOXO očekivano radi statistički značajan zastoj u G2/M fazama staničnog ciklusa u rezistentnoj liniji ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na uvjete bez tretmana, dok u parentalnoj liniji 48 sati nakon tretmana dovodi do pojave populacije sub-G1 ( $p < 0,0001$ ). Populacija sub-G1 izdvaja se kao signal prije same faze G1 (Slika 4.38) te predstavlja staničnu populaciju s fragmentiranom DNA koja potencijalno ulazi u proces apoptoze (272). Isti trend vidljiv je u parentalnoj liniji 48 sati nakon tretmana 25  $\mu\text{M}$  GANT61, gdje se u odnosu na uvjete bez tretmana može detektirati statistički značajno povećanje populacije sub-G1 ( $p < 0,0001$ ). Suprotno tome, u rezistentnoj staničnoj liniji 24 sata nakon tretmana 25  $\mu\text{M}$  GANT61 dolazi do pojave populacije sub-G1 ( $p = 0,0008$ ), koja se 48 sati nakon tretmana ponovo smanjuje ( $p = 0,0053$ ), što se može potencijalno povezati s adaptivnim mehanizmima kojima se pokušava zaobići apoptoza. Tretman 25  $\mu\text{M}$  GANT61 u rezistentnoj staničnoj liniji dovodi do povećanja udjela stanica u fazama G0/G1 ( $p = 0,0002$ ).



**Slika 4.38.** Analiza histograma staničnog ciklusa rezistentne stanične linije Mel 224 u uvjetima bez tretmana (A), nakon tretmana 100 nM DOXO (B) i 25  $\mu\text{M}$  GANT61 (C) te izgled višejezgrenih stanica (označene bijelom strelicom) (D). Plavi signali označavaju staničnu populaciju u fazama G0/G1, ljubičasti fazi S, a svijetlo zeleni fazama G2/M. Zelenim strelicama označena je populacija sub-G1 koja se javlja nakon tretmana DOXO i GANT61. Crvenim strelicama označena je populacija višejezgrenih stanica koja se može detektirati u svim uzorcima.

Neovisno o tretmanu, u svakom uzorku može se detektirati udio stanične populacije koji se izdvaja kao signal nakon faze G2 te potencijalno predstavlja višejezgrene stanice (Slika 4.38D). Tretmani DOXO i 25  $\mu\text{M}$  GANT61 dovode do statistički značajnog povećanja navedene populacije u odnosu na parentalnu liniju ( $p=0,0001$ ;  $p=0,0005$  redom). Višejezgrene stanice vrlo su česta pojava u tumorskim staničnim linijama te su rezultat genomske nestabilnosti koja dovodi do nekontrolirane diobe i fuzije stanica. Smatra se da vrlo često takve stanice preživljavaju tretmane terapeutcima te se stoga povezuju s lošijom prognostičkom slikom pacijenata (273).

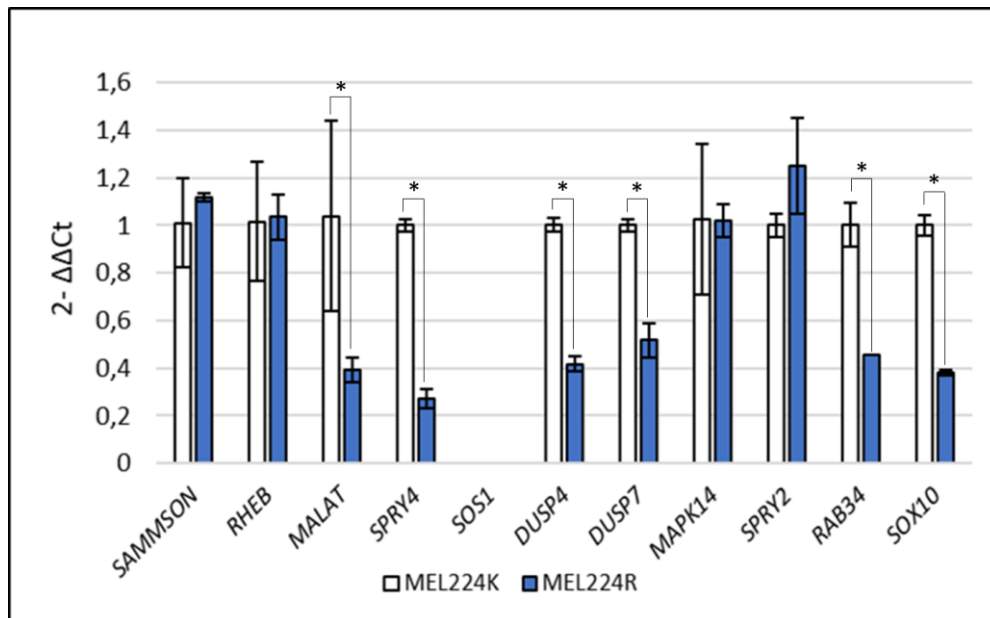


**Slika 4.39.** Analiza staničnog ciklusa u rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1. A) Analiza staničnog ciklusa 24 sata nakon tretmana. B) Analiza staničnog ciklusa 48 sati nakon tretmana. Na apscisi se označeni pojedini tretmani, a na ordinati postotak stanica u fazama staničnog ciklusa sub-G1 (bijelo), G0/G1 (crno), S (narančasto) i G2/M (sivo) te polinuklearne stanice (crveno). PL označava kontrolnu parentalnu liniju, a RL rezistentnu staničnu liniju. NT označava netretirane uzorke, DOXO tretman 100 nM doksorubicinom, a GANT61 10 i 20 istoimene tretmane u koncentracijama  $\mu\text{M}$ .

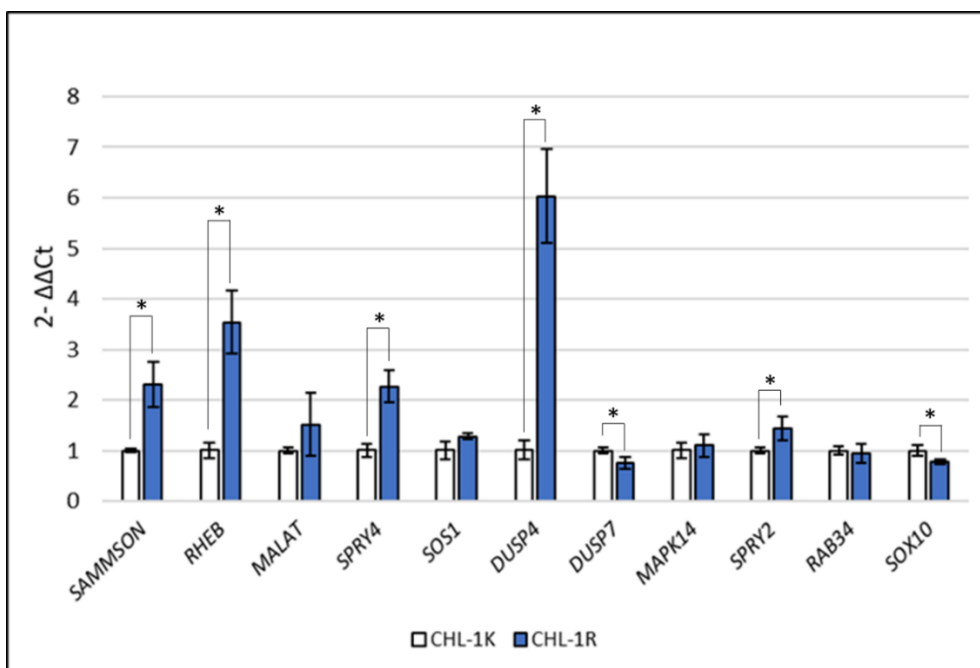
Profili staničnog ciklusa parentalne i rezistentne linije CHL-1 u uvjetima bez tretmana se razlikuju (Slika 4.39). U vremenskoj točki 48 sati, rezistentna stanična linija u odnosu na parentalnu ima statistički značajno povećanje stanične populacije u fazama G0/G1 ( $p=0,0001$ ). Tretman DOXO dovodi do očekivane akumulacije stanica u fazama G2/M u rezistentnoj staničnoj liniji nakon 24 sata ( $p<0,0001$ ), no nakon 48 sati se taj učinak gubi i dolazi do povećanja populacije stanica u fazi sub-G1, što indicira ulazak u apoptozu. Suprotno tome, u kontrolnoj liniji tretman DOXO isprva dovodi do povećanja populacije sub-G1 u odnosu na uvjete bez tretmana (bez statističke značajnosti) te nakon 48 sati dolazi do statističke značajne akumulacije stanica u G2/M ( $p<0,0001$ ). Kod kontrolnih stanica tretman 10  $\mu\text{M}$  GANT61 dovodi do statistički značajnog nakupljanja stanica u G0/G1 već nakon 24h ( $p=0,0001$ ), dok se u rezistentnoj liniji taj učinak dobiva tek nakon 48h, i to pri obje korištene doze (GANT61 10  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0002$ ); GANT61 20  $\mu\text{M}$   $p=0,0001$ ). Tretman 20  $\mu\text{M}$  GANT61 u rezistentnoj liniji dodatno dovodi do pojave populacije stanica u sub-G1 ( $p=0,0001$ ).

## 4.6 Analiza gena identificiranih analizom ChIP na uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama

Kako bismo dalje okarakterizirali uspostavljene rezistentne stanične linije, ispitana je genska ekspresija manjeg panela gena koji su analizirani kao potencijalne transkripcijske mete proteina GLI: *SAMMSON*, *RHEB*, *MALAT*, *SPRY4*, *SOS1*, *DUSP4*, *DUSP7*, *MAPK14*, *SPRY2*, *RAB34* te *SOX10* (Slika 4.40). Panel analiziranih gena napravljen je na temelju analize postojeće literature tako da su odabrani geni povezani sa signalnim putem RAS/RAF/MAPK. Rezistentna stanična linija Mel 224 s mutacijom u genu *NRAS*, kod koje je prethodno detektirana pojačana proteinska ekspresija komponenti RAS/RAF/MAPK, pokazuje sniženu ekspresiju gena *SPRY4*, *DUSP4*, *DUSP7*, *RAB34* i *SOX10*. Proteini *SPRY4*, *DUSP4* i *DUSP7* poznati su negativni regulatori signalnog puta RAS/RAF/MAPK, tako da njihova smanjena genska ekspresija nije iznenađujuća u staničnom modelu kod kojeg je došlo do prekomjerne aktivacije navedenog signalnog puta. *SOX10* predstavlja transkripcijski faktor koji se smatra biljekom metastaziranja u melanomu. *RAB34* poznati je regulator ciliogeneze. S obzirom da je aktivnost signalnog puta HH-GLI jako ovisna o pravilnom formiranju i funkcioniranju primarne cilije, detaljnije je ispitan protein *RAB34* u kontekstu rezistentnih staničnih linija.



**Slika 4.40.** Analiza genske ekspresije potencijalnih transkripcijskih meta proteina GLI u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 (R). Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije koja je izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  nakon normalizacije na kontrolnu parentalnu liniju (K). Zvezdicom (\*) označene su statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ).



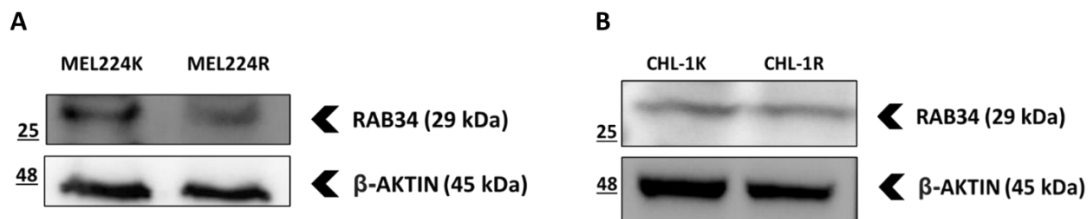
**Slika 4.41.** Analiza genske ekspresije potencijalnih transkripcijskih meta proteina GLI u rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1 (R). Na apscisi su označeni analizirani geni, a na ordinati razina genske ekspresije koja je izražena kao vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  nakon normalizacije na kontrolnu parentalnu liniju (K). Zvezdicom (\*) označene su statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ).

U staničnoj liniji divljeg tipa, CHL-1 također su vidljive promjene u genskoj ekspresiji određenih potencijalnih meta proteina GLI (Slika 4.41). Genska ekspresija negativnih regulatora signalnog puta RAS/RAF/MAPK, *SPRY4* i *DUSP4* snižena je u rezistentnoj staničnoj liniji, što nije iznenađujuće s obzirom na prethodno opaženu sniženu ekspresiju proteinskih komponenti RAS/RAF/MAPK u toj liniji. Ekspresija gena *SAMMSON* i *RHEB* pojačana je u odnosu na kontrolnu liniju. *SAMMSON* je lncRNA izuzetno važna za preživljenje i metabolizam stanica u razvoju melanoma.



#### 4.6.1 Ekspresija proteina RAB34 u uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama

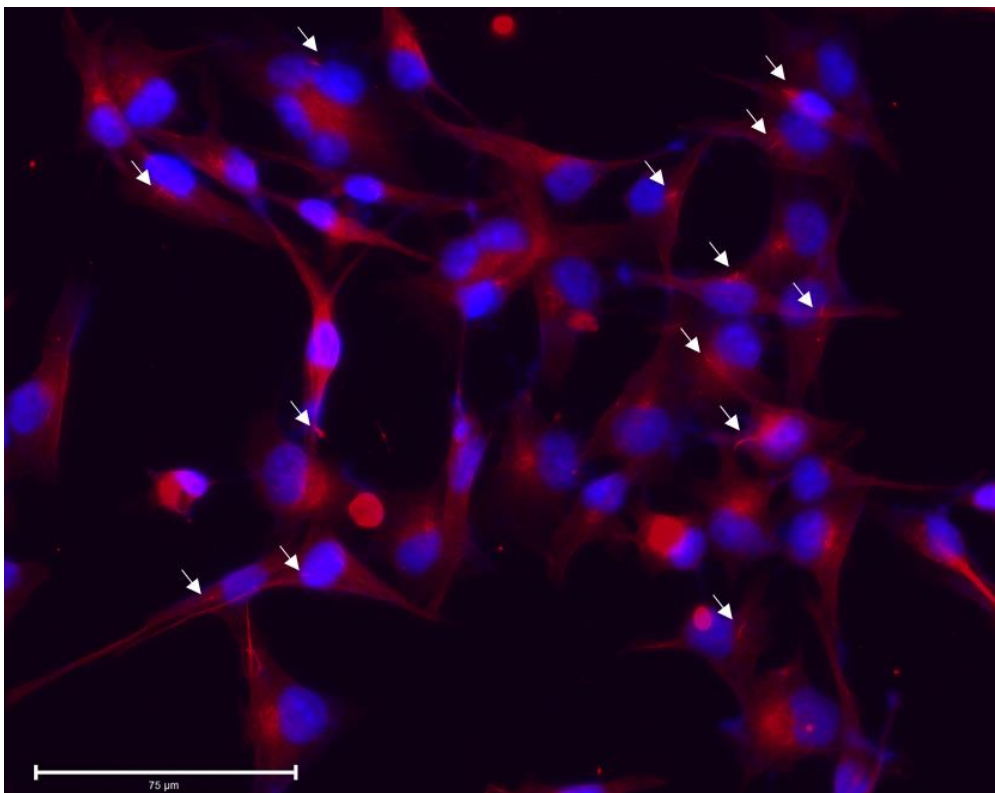
Kako bi se ispitale prethodno uočene promjene na genskoj razini, ispitana je proteinska ekspresija RAB34 na uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama te njihovim parentalnim linijama (Slika 4.42). Kod stanične linije Mel 224 kao i na genskoj razini, u rezistentnoj liniji vidljiva je smanjena ekspresija proteina RAB34, dok u rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1 nema promjena u ekspresiji proteina RAB34 u odnosu na kontrolnu liniju.



**Slika 4.42.** Proteinska ekspresija RAB34 u rezistentnim staničnim linijama Mel 224 (A) i CHL-1 (B) i njihovim parentalnim linijama.  $\beta$ -aktin korišten je kao kontrola nanošenja proteina.

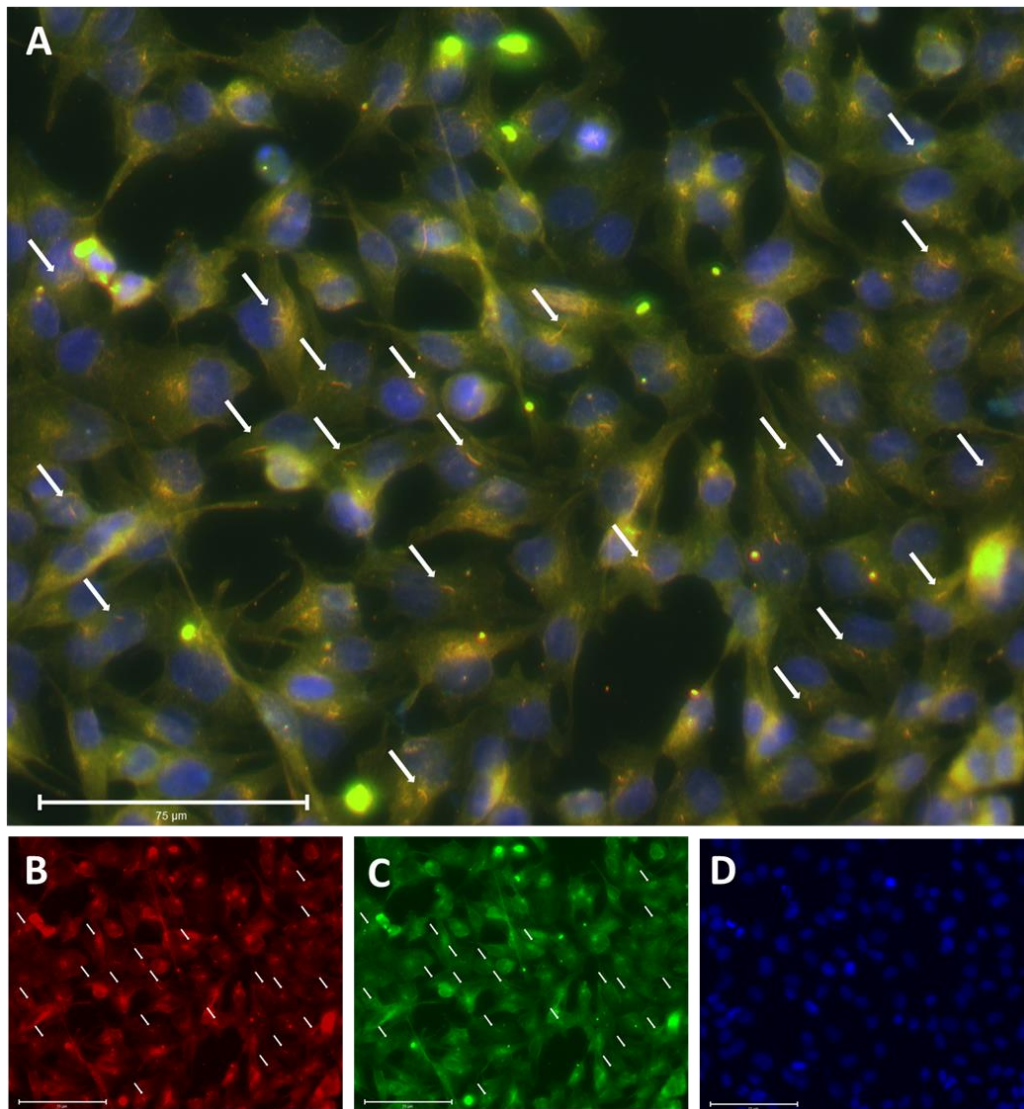
#### 4.6.2 Imunofluorescentna vizualizacija primarnih cilija

S obzirom na to da je proteinski izražaj RAB34 promijenjen u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224, imunofluorescentnim bojanjem provjereno je stvaraju li te stanice i u kojoj mjeri, primarne cilije. U tu svrhu rađena je detekcija acetiliranog oblika proteina  $\alpha$ -tubulina koji se u takvom obliku snažno akumulira u tijelu primarne cilije te detektira kao prstolika struktura na površini stanične membrane. S obzirom da u melanomu vrlo često dolazi do gubitka primarnih cilija, prije same detekcije istih, bilo je potrebno optimizirati uvjete kojima će se osigurati što bolji eksperimentalni uvjeti za vizualizaciju cilija. Zato su stanice uzgajane kroz nekoliko vremenskih točaka (24, 48 i 72 sata) u uvjetima s i bez prisutnosti seruma u mediju te tretirane spojem SAG (agonist SMO) u koncentraciji od 2,5  $\mu$ M koji dovodi do akumulacije koreceptora SMO u primarnoj ciliji (274). Usporedbom navedenih uvjeta, uočeno je da je vizualizacija primarnih cilija najuspješnija nakon 72 sata u uvjetima bez seruma i tretmana SAG (Slika 4.43).



**Slika 4.43.** Optimizacija uvjeta za imunofluorescentnu vizualizaciju primarnih cilija na staničnoj liniji Mel 224. Acetilirani  $\alpha$ -tubulin vidljiv je kao crveni signal dok su jezgre stanica plave zbog bojenja bojom DAPI. Detektirane cilije vidljive su kao prstolike strukture te su označene bijelim strelicama.

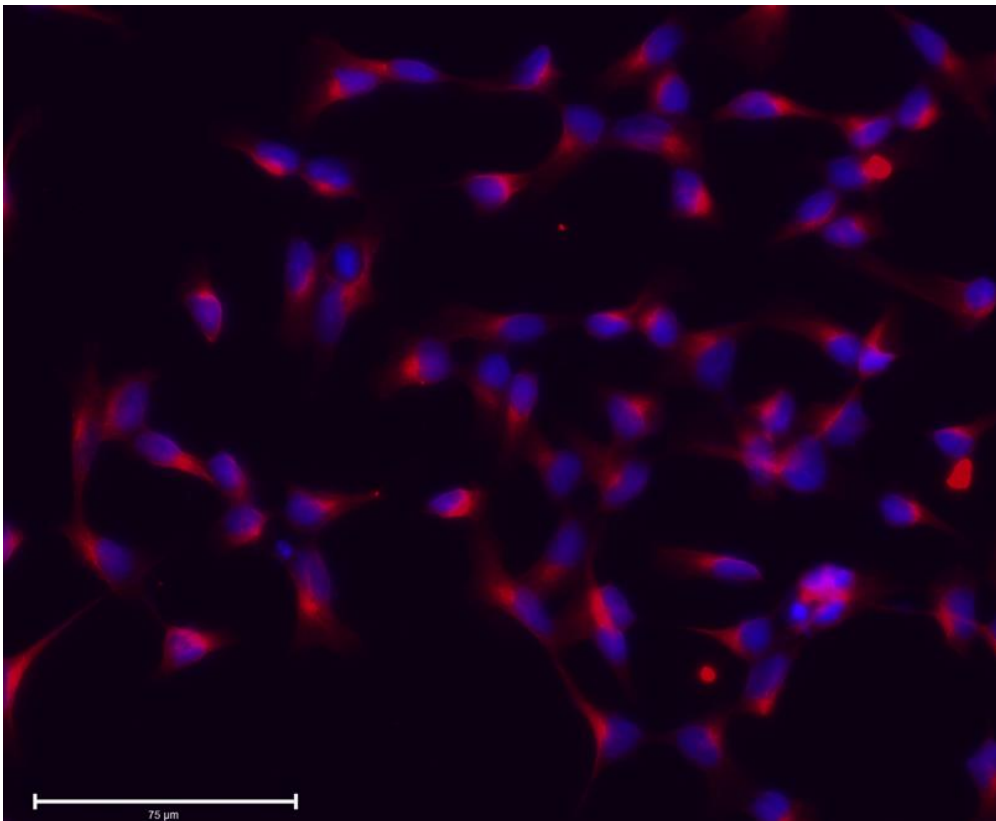
Nakon što su uvjeti za vizualizaciju primarnih cilija optimizirani, provjereno je akumulira li se RAB34 kao regulator procesa ciliogeneze zaista u primarnim cilijama u našim uzorcima. Usporedbom zasebnih kanala detekcije acetiliranog  $\alpha$ -tubulina (crveno) i RAB34 (zeleno) vidljivo je da se oba proteina akumuliraju u primarnim cilijama (Slika 4.44).



**Slika 4.44.** Provjera kolokalizacije acetiliranog  $\alpha$ -tubulina i RAB34 u primarnim cilijama (A). Pojedinačni kanali lokalizacije acetiliranog  $\alpha$ -tubulina (crveno) (B), RAB34 (zeleno) (C) i jezgara stanica koje su vizualizirane pomoću boje DAPI (plavi signal) (D). Bijelim strelicama označene su primarne cilije u kojima se istovremeno ekspimiraju oba proteina.

Kvantifikacija primarnih cilija napravljena je kako bi se vidjelo postoje li razlike u sposobnosti formiranja primarnih cilija u rezistentnim staničnim linijama. Nakon vizualizacije cilija, uzorci su fotografirani u sedam vidnih polja te su identificirane cilije izbrojene i kvantificirane u odnosu na ukupan broj identificiranih jezgara stanica. U slučaju stanične linije Mel 224 opaženo je da rezistentna stanična linija koja ima smanjenu ekspresiju RAB34, zaista stvara manji broj cilija

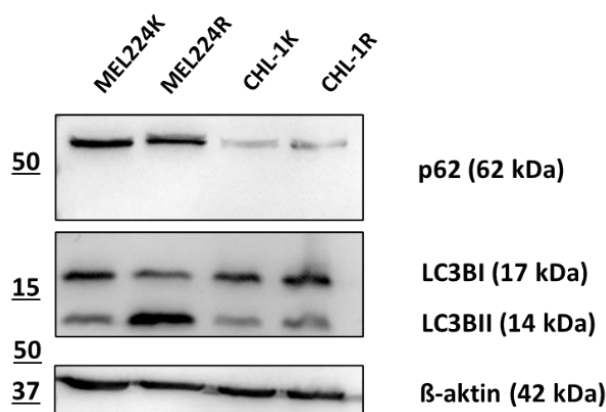
u odnosu na parentalnu liniju. U slučaju parentalne stanične linije analizirano je 1410 jezgara u 7 vidnih polja te su pronađene 64 cilije, što znači da ukupno 4,539 % stanica stvara primarne cilije. Kod rezistentne stanične linije, analizirano je 1945 jezgara u 6 vidnih polja te pronađeno 48 primarnih cilija, što znači da 2,468 % stanica stvara cilije. Iako se u oba slučaja rado o vrlo malom ukupnom postotku identificiranih cilija, rezistentna stanična linija ima smanjen potencijal ciliogeneze za 54,37 % u odnosu na parentalnu liniju ( $p=0,0308$ ). U slučaju stanične linije divljeg tipa, CHL-1 primarne cilije nisu detektirane uopće što je uobičajeno za stanice melanoma (Slika 4.45). Zanimljivo je što obje linije, i parentalna i rezistentna, eksprimiraju protein RAB34, što znači da njegova ekspresija nije isključivo vezana za proces ciliogeneze.



**Slika 4.45.** Odsutnost primarnih cilija u staničnoj liniji CHL-1. Primarne cilije nisu detektirane kroz vizualizaciju acetiliranog  $\alpha$ -tubulina (crveni signal) i jezgara stanica (plavi signal).

### 4.6.3 Analiza autofagije u rezistentnim staničnim linijama

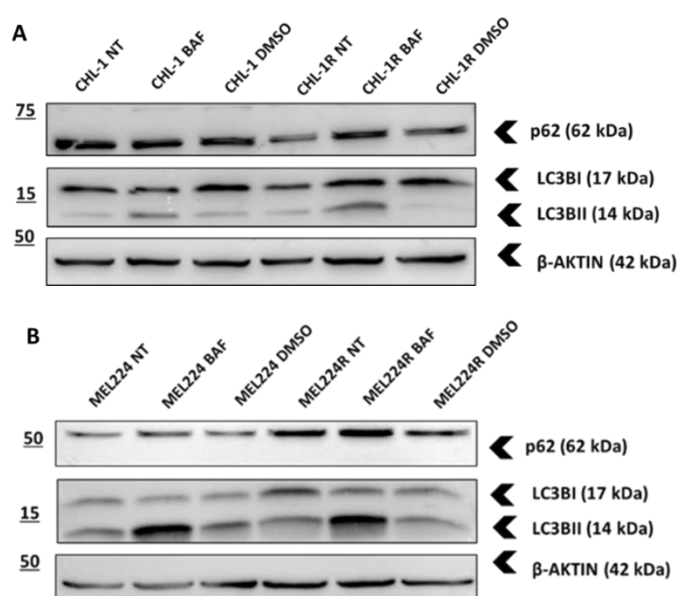
Budući da su ciliogeneza i autofagija usko povezani procesi, u radu je ispitana ekspresija biljega autofagije u rezistentnim staničnim linijama te analizirano kako stanice reagiraju na tretmane kemijskim spojevima koji modificiraju proces autofagije. Prvo je provjerena bazalna proteinska ekspresija biljega autofagije, p62 i LC3B (Slika 4.46). LC3B se smatra mnogo točnijim markerom autofagije jer se njegova aktivna forma LC3BII regrutira u membranu autofagosoma, dok p62 ima i druge nespecifične funkcije osim autofagije. U staničnoj liniji Mel 224 vidljiva je pojačana ekspresije LC3BII u rezistentnoj liniji u odnosu na kontrolnu, dok je ekspresija više-manje nepromijenjena u staničnoj liniji CHL-1. Ekspresija p62 ostala je nepromijenjena, ali je vidljivo da stanična linija Mel 224 inicijalno jače eksprimira p62 od stanične linije CHL-1.



**Slika 4.46.** Bazalna proteinska ekspresija biljega autofagije p62 i LC3B u rezistentnim staničnim linijama i njihovim kontrolama. β-aktin korišten je kao kontrola nanošenja proteina.

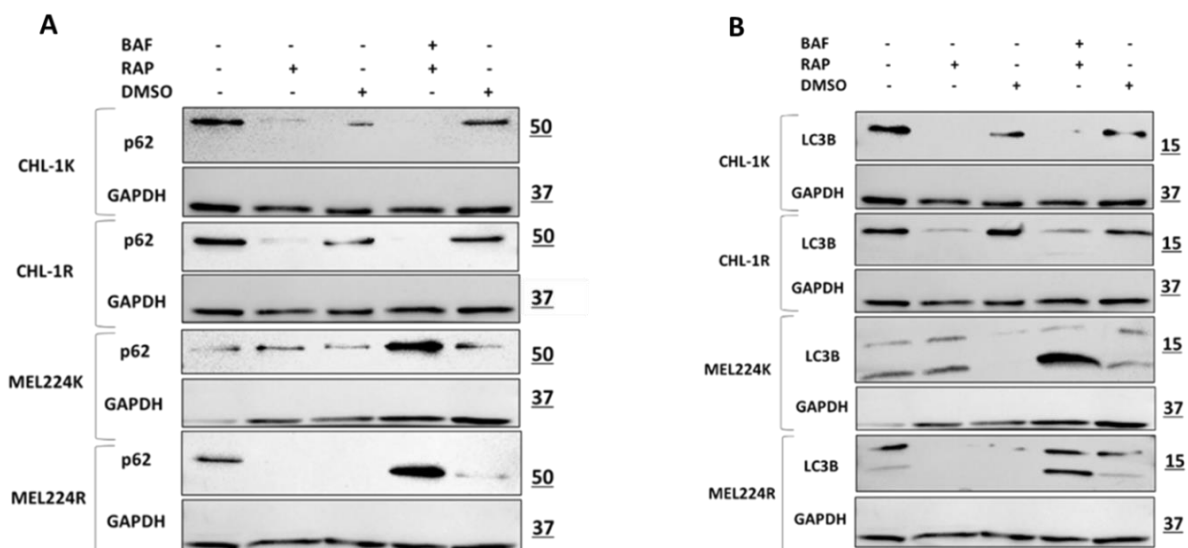
Nakon što je provjerena ekspresija biljega autofagije u bazalnim uvjetima, stanice su tretirane kemijskim spojevima koji modificiraju proces autofagije kako bi mogli zaključiti kako je autofagija regulirana u našim staničnim linijama. Tretman 100 nm bafilomicinom A1, poznatim inhibitorom autofagije, trebao bi izazvati blokadu autofagije i nakupljanje biljega autofagije p62 i LC3B (Slika 4.47). Očekivani učinak vidljiv je u staničnoj liniji divljeg tipa CHL-1. Vidljivo je nakupljanje aktivne forme LC3BII u obje linije, parentalnoj i rezistentnoj, dok sama kontrola otapala, DMSO nema nikakav učinak. U slučaju biljega p62, učinak je vidljiv isključivo u rezistentnoj liniji. U staničnoj liniji Mel 224 tretman bafilomicinom A1 uzrokuje očekivano akumuliranje p62 i LC3BII u kontrolnoj i rezistentnoj liniji. Kako bi se u potpunosti razjasnilo kako autofagija funkcionira u uspostavljenim rezistentnim linijama, navedene linije tretirane su 0,5 μM rapamicinom, aktivatorom autofagije te kombiniranim tretmanom 100 nM bafilomicina i 0,5 μM rapamicina (Slika 4.48). Tretman aktivatorom autofagije trebao bi potaknuti autofagiju i ne bi trebalo doći do nakupljanja navedenih biljega. Kombiniranjem tretmana bafilomicina A1 i rapamicina može se zaključiti kako autofagija funkcionira ovisno o tome koji tretman će imati

dominantniji efekt. U staničnoj liniji CHL-1, tretman rapamicinom dovodi do očekivanog učinka te nema akumulacije markera p62. Čak i u kombiniranom tretmanu, rapamicin nadjačava inhibitorni učinak bafilomicina, te ne dolazi do akumulacije p62. U slučaju LC3B, jednaki učinak vidimo kod parentalne linije gdje je autofagija i dalje aktivna, dok se u rezistentnoj staničnoj liniji detektira blokada autofagije u obliku nakupljanja proteina LC3BII unatoč tretmanu rapamicinom. Kod stanične linije Mel 224 vidljiv je suprotan učinak. Kontrolna linija Mel 224 ne reagira na aktivaciju rapamicinom, te se mogu detektirati p62 i LC3B. U kombiniranom tretmanu, bafilomicin A1 svojim inhibitornim učinkom nadjačava učinak rapamicina te je vidljiva snažna akumulacija p62 i LC3BII.



**Slika 4.47.** Analiza biljega autofagije p62 i LC3B nakon tretmana 100 nm bafilomicinom (BAF) u rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1 (A) i MEL224 (B). DMSO je korišten kao kontrola otapala spoja. β-aktin korišten je kao kontrola nanošenja proteina.

Iako bi se na temelju rezultata dobivenih analizom biljega p62 zaključilo da autofagija u rezistentnoj liniji ne funkcionira, analiza točnijeg biljega LC3B ukazuje na suprotan trend. U kombiniranom tretmanu LC3BII može se detektirati, ali mnogo manje nego u kontrolnoj liniji. Isto tako, u rezistentnoj staničnoj liniji, omjer formi LC3BI LC3BII veći je u korist neaktivne forme LC3BI. Na temelju provedenih eksperimenata, može se zaključiti da je u slučaju stanične linije divljeg tipa CHL-1, autofagija iz nekog razloga poremećena u rezistentnoj staničnoj liniji u odnosu na kontrolu. U slučaju stanične linije Mel 224, aktivnost autofagije je jača u rezistentnoj liniji. Kada se usporede stanične linije međusobno, stanična linija CHL-1 inicijalno ima izrazitiju aktivnost autofagije nego stanična linija Mel 224.



**Slika 4.48.** Analiza biljega autofagije p62 (A) i LC3B (B) nakon tretmana rapamicinom (RAP) te kombiniranog tretmana rapamicina (RAP) i bafilomicina (BAF) na rezistentnim staničnim linijama CHL-1 i Mel 224 te njihovim kontrolama. Oznakama +/- označeno je li neki spoj prisutan u tretmanu ili ne. DMSO je korišten kao kontrola otapala spoja. GAPDH je korišten kao kontrola nanošenja proteina.

## 5. RASPRAVA

Signalni put Hedgehog-GLI od iznimne je važnosti za normalan embrionalni razvoj. Danas je poznato da poremećena aktivnost HH-GLI potiče karcinogenezu manipulirajući osnovnim staničnim procesima poput preživljenja, staničnog ciklusa, apoptoze, migracije i odgovora na terapiju (275). Prethodnim istraživanjima već je pokazana aktivnost HH-GLI u nastanku i progresiji melanoma. Signalni put RAS/RAF/MAPK put je prijenosa koji je najčešće promijenjen u melanomu, stoga je jedan od ključnih nositelja karcinogenih svojstava melanoma (11). Signalni putevi RAS/RAF/MAPK i HH-GLI kroz nekanonske interakcije neovisne o membranskim komponentama, mogu stanici osigurati funkcioniranje alternativnih mehanizama kojima se dalje održavaju karcinogena svojstva, no te interakcije su još uvijek slabo opisane (128). Dosadašnje publikacije uglavnom se fokusiraju na nekanonsku aktivaciju HH-GLI putem RAS/RAF/MAPK, no još uvijek nije poznato kako HH-GLI povratno može djelovati na aktivaciju RAS/RAF/MAPK. U ovom radu, razvijajući stanične linije rezistentne na GANT61 i kroz identifikaciju transkripcijskih meta proteina GLI, ispitana je interakcija i međuovisnost signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI u procesu rezistencije na lijekove u staničnim linijama melanoma. Glavni cilj ovog doktorskog rada bio je pokazati da je interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI važna u procesu rezistencije na lijekove. Naime, boljim razumijevanjem tih interakcija, otvaraju se mogućnosti za razvoj kombinirane terapije u budućnosti.

Transkripcijski faktori GLI predstavljaju glavne efektore signalnog puta HH-GLI time što vezanjem za promotore svojih ciljnih gena, kontroliraju niz staničnih procesa (40). Unatoč brojnim istraživanjima zadnjih desetljeća, funkcije proteina GLI1, GLI2 i GLI3 još su uvijek relativno slabo opisane. Jedan od načina kojim se može opisati funkcija nekog proteina je identifikacija njegovih nizvodnih meta. U ovom istraživanju, koristeći metodu *ChIP-seq* identificirane su potencijalne transkripcijske mete proteina GLI u staničnim linijama melanoma. Kako bi se identificirao što veći broj potencijalnih transkripcijskih meta, ispitana je aktivnost signalnog puta HH-GLI prateći gensku i proteinsku ekspresiju GLI1, GLI2 i GLI3 na panelu staničnih linija melanoma različitog mutacijskog statusa gena *BRAF* i *NRAS*. Proteini *BRAF* i *NRAS* dio su signalnog puta RAS/RAF/MAPK te predstavljaju najčešće mutirane komponente koje za rezultat imaju konstitutivan put prijenosa (11). Na temelju analize genske ekspresije *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*, vidljivo je da je ekspresije detektirana u svim linijama neovisno o mutacijskom statusu *BRAF* i *NRAS* (**Poglavlje 4.1.1, Slika 4.1**). Na razini proteina, ekspresija je raznolika, GLI1 i GLI2 su nejednoliko ekspimirani, dok je ekspresija proteina GLI3 najjača, stabilna i konzistentna u svim staničnim linijama (**Poglavlje 4.1.2, Slika 4.2**). Iako se protein GLI3 primarno zbog svoje dominantne represorske prirode povezuje s protektivnim protutumorskim svojstvima, nedavna istraživanja ukazuju na to da GLI3 može i promovirati



karcinogenezu uslijed izmijenjenog procesiranja. Zubčić i suradnici pokazali su da se u staničnim linijama tumora glave i vrata, glavni inhibitorski efekt na HH-GLI ostvaruje preko proteina GLI3 čime se smanjuju protumorska svojstva poput preživljenja stanica, migracijskog kapaciteta i potencijala formiranja kolonija (239). Reda i suradnici objavili su studiju u kojoj su ispitali ekspresiju komponenti HH-GLI na širokom panelu staničnih linija među kojima su bile prisutne i stanične linije melanoma (276). Za razliku od našeg istraživanja gdje je ekspresija proteina GLI3 bila najjača u svim linijama, u njihovoj je studiji ekspresija GLI1 i GLI2 bila najznačajnija. Zanimljivo, iako ekspresija proteina GLI1 i GLI2 varira među staničnim linijama, ekspresija proteina PTCH1, direktne transkripcijske mete HH-GLI, koji se smatra markerom aktivnosti ovog signalnog puta, jednako je stabilna kao ekspresija GLI3 među linijama. U svakom slučaju, vidljivo je da su komponente HH-GLI eksprimirane te da je signalni put u staničnim linijama melanoma aktivan. Santini i suradnici prethodno su pokazali da je aktivnost HH-GLI nužna za samoobnavljanje i ostala karcinogena svojstva stanica koje iniciraju nastanak melanoma (109). Nakon što je potvrđeno da stanične linije melanoma eksprimiraju proteine GLI, ispitan je odgovor stanica na inhibiciju HH-GLI tretmanom GANT61 (**Poglavlje 4.1.3, Slika 4.4**). Neovisno o mutacijskom statusu, sve stanične linije pokazale su trend smanjenja preživljenja s povećanjem njegove koncentracije. Naša opažanja potvrdilo je prethodno spomenuto istraživanje Reda i suradnika koji su pokazali da GANT61 djeluje negativno na preživljenje analiziranih staničnih linija (276). Zanimljivo, iako bi se očekivalo da su stanične linije s jačom ekspresijom proteina GLI osjetljivije na tretman GANT61, u našoj studiji ekspresija GLI nije se mogla povezati s osjetljivošću na tretman. Među linijama, ovisno o mutacijskom statusu gena *BRAF* i *NRAS*, mogu se vidjeti razlike u preživljenju. Vidljivo je da su stanične linije s heterozigotnom mutacijom u genu *BRAF* najosjetljivije, a stanične linije s homozigotnom mutacijom *BRAF* i *NRAS* te stanične linije divljeg tipa nešto otpornije na tretman GANT61, no bez statističke značajnosti (277). Opažene razlike nisu neuobičajene, s obzirom na postojanje velikog broja publikacija koje podupiru stajalište o postojanju različitih karakteristika melanoma ovisno o mutacijskom statusu gena *BRAF* i *NRAS*. Istraživanje Stones i suradnika u skladu je s našim opažanjima te je pokazalo da su stanične linije melanoma s mutacijom *BRAF* osjetljivije na inhibiciju RAS/RAF/MAPK od staničnih linija s mutacijom u genu *NRAS* (278). Suprotno tome i našoj studiji, Carlino i suradnici pokazali su da mutacijski status *BRAF/NRAS* nema utjecaj na kemoosjetljivost staničnih linija melanoma (279). U odnosu na inhibitore uzvodnih komponenti HH-GLI, tretman GANT61 izaziva najjači učinak na smanjenje preživljenja što pokazuje da aktivacija proteina GLI u melanomu ne ovisi isključivo o kanonskoj signalnoj kaskadi HH-GLI. Stecca i suradnici među prvima su pokazali da je u melanomu nužna nekanonska aktivacija HH-GLI, ističući RAS/RAF/MAPK kao jedan od glavnih puteva prijenosa koji djeluju na proteine GLI (105). Upravo je nekanonska aktivacija

HH-GLI jedan od glavnih razloga zašto je inhibicija uzvodnih komponenti vrlo često neefikasna i rezultira razvojem rezistencije.

Unatoč odabiru staničnih linija s najjačom endogenom ekspresijom proteina GLI1, GLI2 i GLI3, analiza ChIP-seq pokazala je da je pokrivenost sekvenciranja bila manja od očekivane. Ovakve poteškoće su se potencijalno mogle zaobići tako da se linije dodatno transfeciraju ekspresijskim plazmidima za proteine GLI, no u našem slučaju se studija temeljila na analizi endogenih proteina koji najrealnije prikazuju transkripcijske profile. Najveći broj potencijalnih transkripcijskih meta imaju proteini GLI1 i GLI2, što ne iznenađuje s obzirom na sličnost konsenzus sekvenci koje prepoznaju te zajedničku dominantnu aktivatorsku prirodu (**Poglavlje 4.3, Slika 4.7**). Postojeće studije su se do sada fokusirale isključivo na identifikaciju transkripcijskih meta GLI1 i GLI2 iz navedenih razloga, podosta zanemarujući protein GLI3. Ali i suradnici identificirali su transkripcijske mete GLI1 i GLI2 u neoplastičnim hondrocitima (280). Protein GLI3 ima najmanji broj potencijalnih transkripcijskih meta što se može hipotetski objasniti tako što GLI3 dominantno djeluje direktno na GLI1 te na tako indirektno regulira čitav niz transkripcijskih meta odnosno staničnih procesa (281). Naša studija predstavlja jedino istraživanje gdje su istovremeno opisani transkripcijski profili proteina GLI1, GLI2 i GLI3. S obzirom na to da je cilj ovog istraživanja bio opisati interakciju HH-GLI i RAS/RAF/MAPK identificirajući potencijalne posrednike, selekcija transkripcijskih meta za daljnju validaciju napravljena je tako da su odabrani geni koji su vezani uz regulaciju RAS/RAF/MAPK. Do sada opisani mehanizmi interakcije HH-GLI i RAS/RAF/MAPK rezultat su direktne regulacije proteina GLI putem komponenti RAS/RAF/MAPK (128). Smatra se da indirektno interakcije jednako doprinose regulaciji proteina GLI preko RAS/RAF/MAPK, no one još uvijek nisu opisane. Prilikom selekcije ciljnih meta izdvojila se grupa miRNA uključena u regulaciju gena od kojih su mnogi komponente signalnog puta RAS/RAF/MAPK (**Poglavlje 4.4.3, Slike 4.17 - 4.19**). Važnost molekula miRNA u regulaciji RAS/RAF/MAPK vidljiva je u procesima proliferacije, preživljenja, diferencijacije i odgovora na terapiju koji su izmijenjeni zbog najčešće smanjene ekspresije miRNA i onemogućene posttranskripcijske represije ciljnih meta (282). Kao potencijalna transkripcijska meta GLI1 izdvojila se mir-3194. Wei i suradnici pokazali su da mir-3194 djeluje tumor supresorski u karcinomu dojke jer smanjuje proliferaciju, migraciju i invaziju ciljajući akvaporin 1, poznati supstrat RAS/RAF/MAPK (283). Na prekomjernu ekspresiju GLI2 najjače je reagirala mir-3065, miRNA za koju su Palkina i suradnici pokazali da djeluje protutumorski i da je često smanjeno eksprimirana u melanomu (284). Suprotno tome, studija Li i suradnika pokazuje da mir-3065 promovira metastaziranje i očuvanje matičnih svojstva stanica karcinoma debelog crijeva jer utištava *CRLF1*, potencijalni inhibitor RAS/RAF/MAPK i PI3K/AKT (285). Kao zajednička meta miRNA proteina GLI, izdvojila se mir-3648-2 koja inhibirajući tumorske supresor gene poput *APC2* u tumoru

prostate promovira preživljenje i proliferaciju stanica (286). Navedene miRNA stabilno se ponašaju među analiziranim staničnim linijama što ukazuje na to da imaju ulogu u melanomu, što je od velike važnosti s obzirom na to da se neke od njih do sada uopće nisu dovodile u vezu s melanomom. Identificirane miRNA predstavljaju vrijedan materijal za buduća istraživanja s obzirom na to da one još uvijek nisu opisane kao potencijalne transkripcijske mete proteina GLI. U slučaju validacije transkripcijskih meta koje kodiraju za proteinske produkte, vidljive su velike razlike među analiziranim linijama koje mogu biti posljedica različitog mutacijskog statusa *BRAF* i *NRAS* ili specifičnosti određene stanične linije (**Poglavlje 4.4.1, Slike 4.13 – 4.15**). Filaggrin (*FLG*) ističe se kao potencijalna meta GLI1 i GLI2 specifična za staničnu liniju A375 s mutacijom u genu *BRAF*. Filaggrin je iznimno važan u održavanju kožne barijere, a njegova poremećena funkcija povezana je s povećanom proliferacijom i angiogenezom u melanomu (287). Kao specifična meta GLI2 u staničnoj liniji Mel 224 s mutacijom u genu *NRAS* ističe se gen *RAB34*, koji kodira za malu GTP-azu koja se povezuje s kontrolom invazije, migracije, adhezije, ciliogeneze i intracelularnog transporta, te je ujedno mogući supstrat RAS/RAF/MAPK (288). Kod potencijalnih transkripcijskih meta proteina GLI3 vidljiva su dva trenda nakon prekomjerne ekspresije, smanjenje genske ekspresije u slučaju *SOX10* i *MAPK14*, te povećanje genske ekspresije u slučaju *JUND*, *CDKN2C*, *BCL9* i *CDC6*. Za transkripcijski faktor *SOX10* poznato je da kontrolira čitav spektar procesa važnih u razvoju melanoma, primarno preko regulacije transkripcijskog faktora MITF (289). Kinaza *MAPK14* od velike je važnosti za migraciju i epitelno-mezenhimalnu tranziciju stanica melanoma (290). *CDKN2C* predstavlja inhibitor kinaza ovisnih o ciklinu, regulatoru staničnog ciklusa čija je funkcija u melanomu često utišana (291). Iz navedenih primjera može se spekulirati o potencijalnoj protektivnoj ulozi GLI3 u melanomu, no također se mora uzeti u obzir pozitivna regulacija gena *JUND*, *BCL9* i *CDC6* koji reguliraju plastičnost melanoma, odgovor stanica na inhibiciju RAS/RAF/MAPK i mnoge druge maligne karakteristike (292,293). Kao i u slučaju miRNA, identificirani geni od velike su važnosti za buduća istraživanja jer se do sada nisu povezivali s transkripcijskom regulacijom proteina GLI.

Zbog iznimne plastičnosti stanica, melanom se odlikuje visokim metastatskim potencijalom i sposobnošću razvoja rezistencije na terapiju. S obzirom na to da je signalni put RAS/RAF/MAPK najčešće promijenjen u melanomu, on ujedno predstavlja i najučestaliju metu za razvoj terapija. Nažalost, čak 80% melanoma razvije rezistenciju na inhibitore BRAF zbog ponovne reaktivacije RAS/RAF/MAPK (201). Smatra se da nekanonske interakcije između signalnih puteva dodatno doprinose razvoju alternativnih mehanizama kojima stanica zaobilazi djelovanje terapeutika. Iz tog razloga kombinirana terapija kojom se cilja više komponenti jednog ili više signalnih puteva predstavlja strategiju kojom se potencijalno mogu blokirati alternativni mehanizmi. Važnost interakcije HH-GLI i RAS/RAF/MAPK u rezistenciji

na terapiju već potvrdili su neki autori poput Faião-Flores i suradnika koji su pokazali da inhibicija GLI1 i GLI2 u stanicama melanoma rezistentnim na vemurafenib čini stanice ponovno osjetljivima (208). U sklopu ovog istraživanja fokus je stavljen na razvoj staničnih linija melanoma koje su rezistentne na GANT61 zbog toga što se inhibicija uzvodnih komponenti HH-GLI poput koreceptora SMO pokazala neučinkovitom u karcinomima koji preferiraju nekanonski put prijenosa. Bolje razumijevanje interakcije HH-GLI i RAS/RAF/MAPK može rezultirati naprednijim terapijskim strategijama jer se potencijalno može predvidjeti koje su "slabe točke" tumorskih stanica koje treba ciljati.

U ovom istraživanju uspješno su uspostavljene stanične linije Mel 224 i CHL-1 rezistentne na GANT61. Zbog iznimne preosjetljivosti na tretman GANT61 nismo mogli uspostaviti staničnu liniju RPMI-7951, što potvrđuje naše prethodne rezultate koji pokazuju da su linije s heterozigotnom mutacijom u genu *BRAF* najosjetljivije na inhibiciju HH-GLI uz pomoć proteina GLI. Obje uspostavljene stanične linije uspješno su validirane provjerom vijabilnosti stanica nakon inhibicije HH-GLI tretmanom GANT61 (**Poglavlje 4.5.1, Slike 4.22 i 4.23**). Provjera vijabilnosti stanica nakon perioda od dva tjedna bez tretmana, kako bi se isključila mogućnost da se radi o toleranciji na terapiju, a ne rezistenciji, pokazala je da su obje stanične linije postale na neki način ovisne o tretmanu GANT61, što je vidljivo kroz smanjenu vijabilnost stanica na nižim koncentracijama GANT61, koja potom raste do određene točke povećanjem doza. Kong i suradnici predložili su model kojim bi se objasnio ovaj fenomen te naglašavaju da jednom kada stanica prilagodi signalnu mašineriju terapeutiku, njegovo uklanjanje uzrokuje gubitak te uspostavljene ravnoteže čime dolazi do smanjenog preživljenja (270). Reakcija na uzvodne inhibitore HH-GLI poput litijevog klorida, ciklopamina, sonidegiba te vismodegiba ostala je nepromijenjena u obje linije, potvrđujući važnost nekanonske aktivacije HH-GLI. U slučaju vismodegiba i sonidegiba, inhibitora koreceptora SMO koji imaju primjenu u klinici, vidljiva je razlika u učinkovitosti koja se slaže s kliničkim ishodima kod pacijenata. Za razliku od tretmana vismodegibom koji ima minimalan utjecaj, vijabilnost staničnih linija se u potpunosti dokida sonidegibom koji je klinički učinkovitiji (269). Zanimljivo, kod stanične linije Mel 224 s mutacijom u genu *NRAS*, vidljiva je kratkotrajna križna otpornosti na arsenov trioksid, nespecifični inhibitor proteina GLI, čime se dodatno potvrđuje važnost nekanonskog prijenosa signala HH-GLI u melanomu. S obzirom na to da se radi o učinku kratkog vijeka, vjerojatno je riječ o reverzibilnoj toleranciji stanica koja se temelji na nespecifičnom mehanizmu koji je neovisan o glavnom mehanizmu razvoja rezistencije na GANT61. Inhibicija signalnog puta RAS/RAF/MAPK uz pomoć salirasiba, inhibitora proteina RAS učinkovita je tek pri najvećoj koncentraciji, te su uočene razlike u vijabilnosti između kontrolnih i rezistentnih linija kod stanične linije divljeg tipa, CHL-1. Iako neki autori pokazuju pozitivan efekt salirasiba na blokiranje tumorskih karakteristika, u melanomu, između ostalog, dominira i nekanonska

aktivacija efektorskih kinaza koja je neovisna o uzvodnim komponentama poput proteina RAS i RAF (294). Inhibitori nizvodnih komponenti poput MEK1/2 i ERK1/2 mogli bi imati jači efekt na vijabilnost stanica. Jedna od prvih promjena zamijećena kod rezistentnih staničnih linija je promjena morfologije tj. pojava mezenhimalnih obilježja stanica, u odnosu na ishodišne kontrolne linije, što upućuje da je tijekom uspostave rezistencije došlo do epitelno-mezenhimalne tranzicije ili je taj proces dodatno induciran (**Poglavlje 4.5.2, Slika 4.24**). To je potvrđeno praćenjem ekspresije epitelnog biljega, *CDH-1*, koji je u rezistentnoj liniji snižen, te mezenhimalnog biljega *VIM*, koji je pojačano ekspimiran. Procesom EMT regulira se čitav niz signalnih kaskada uključenih u diferencijaciju i svojstva matičnih stanica čime se može modulirati odgovor stanica na terapiju (295). Uvidom u ekspresiju komponenti HH-GLI, RAS/RAF/MAPK, biljega EMT-a, proliferacije i matičnih stanica, utvrđeno je da je kod rezistentne stanične linije Mel 224 došlo do velikih promjena (**Poglavlja 4.5.3 i 4.5.4, Slike 4.25 – 4.28**). Ekspresija gotovo svih komponenti HH-GLI, GLI1, GLI2, GLI3 i SMO smanjena je u odnosu na kontrolnu liniju. Moguće je da do ovog ishoda dolazi jer stanice smanjujući aktivnosti HH-GLI pokušavaju izbjeći efekt GANT61, te samim time potencijalno dobivaju selektivnu prednost i preživljavaju tretman. S druge strane, moguće je da se radi o efektu uskog grla, gdje su uslijed tretmana preživjele samo stanice s nižom ekspresijom komponenti signalnog puta, te su one zaslužne za rezistentnu populaciju s nižom ekspresijom. Neovisno o mehanizmu, konačni učinak je isti, snižena aktivnost signalnog puta HH-GLI detektirana je u stanicama rezistentnima na GANT61. Zanimljivo, snižena ekspresija proteina HH-GLI prati povećanu ekspresiju komponenti RAS/RAF/MAPK (osobito krakova ERK i JNK), na temelju čega proizlazi hipoteza da se aktivnošću RAS/RAF/MAPK na neki način pokušava kompenzirati utišavanje aktivnosti HH-GLI. Oba signalna puta kontroliraju esencijalne stanične procese poput preživljenja, staničnog ciklusa, apoptoze i diferencijacije, stoga RAS/RAF/MAPK može zaista predstavljati potencijalni rezervni plan stanica za održavanje nužnih staničnih procesa. Osim toga, krakovi RAS/RAF/MAPK koji su pojačano aktivirani, ERK i JNK povezuju se s promocijom navedenih procesa, dok krak p38, koji je čak smanjeno aktivan regulira iste procese tako da promovira staničnu smrt (20). Pojačana aktivnost RAS/RAF/MAPK potvrđena je u rezistentnoj liniji i protočnom citometrijom gdje je vidljivo da osobito tretman GANT61 potiče dvojnu aktivaciju MAPK i PI3K/AKT (**Poglavlje 4.5.7, Slika 4.35**). Poznato je da protein RAS može također aktivirati kinazu PI3K te tako osigurati simultano funkcioniranje signalnog puta koji podržava slične stanične procese kao i RAS/RAF/MAPK (296). Na genskoj razini, rezistentna stanična linija ima pojačanu ekspresiju biljega matičnih stanica *SOX2* te biljega invazivnosti *MMP2*, što upućuje na povećanje invazivnih svojstva. Povećana invazivnost i agresivnost rezistentne stanične linije potvrđena je i provjerom migracijskog kapaciteta i sposobnosti formiranja kolonija (**Poglavlja 4.5.5 i 4.5.6, Slike 4.29 i 4.31**). Zanimljivo, kada se stanice tretiraju inhibitorima HH-GLI, smanjenje

migracijske sposobnosti vidljivije je u rezistentnoj staničnoj liniji. Jedino tretman GANT61 izaziva suprotan učinak, odnosno, povećanje migracijskog potencijala, što predstavlja trenutno neobjašnjivi trend koji je prethodno uočen i na drugim tumorskim staničnim linijama (239).

U staničnoj liniji divljeg tipa, CHL-1 ekspresijski profil bitno se razlikuje od onog uočenog kod stanične linije Mel 224. Kao i kod rezistentne stanične linije Mel 224, u rezistentnoj liniji CHL-1 vidi se smanjenje ekspresije komponenti HH-GLI, no komponente signalnog puta RAS/RAF/MAPK slabije su aktivne. Kao iznimka izdvaja se krak p38 koji je pojačano eksprimiran u rezistentnoj staničnoj liniji u odnosu na kontrolnu. Unatoč brojnim studijama koje naglašavaju ulogu p38 u kontekstu tumor supresorskog gena kroz aktivaciju stanične smrti, nedavne studije pokazuju da p38 može imati dvojnu ulogu te promovirati karcinogenezu. Kalli i suradnici pokazali su da transkripcijski faktori inducirani EMT-om mogu aktivirati p38 te promovirati migraciju i invaziju stanica (297). Još ranije istraživanje Guo i suradnika pokazalo je da p38 može regulirati ekspresiju transportnih pumpi te tako poticati izbacivanje kemoterapeutika iz stanica i promovirati kemorezistenciju (298). Ekspresijski profil gena koji kodiraju za biljege EMT-a slaže se s prethodnom studijom te može objasniti pojačana invazivna svojstva koja su potvrđena analizom migracijskog kapaciteta i potencijala stvaranja kolonija (**Poglavlja 4.5.5 i 4.5.6, Slike 4.30 i 4.32**). Uz to, na genskoj razini, rezistentna stanična linija CHL-1 pokazuje povećanje ekspresije *MMP2*, želatinaze važne za remodeliranje ekstracelularnog matriksa, što dodatno podupire uočene promjene. Za razliku od aktivacijskih profila MAPK/PI3K stanične linije Mel 224 dobivenih protočnom citometrijom, koji potvrđuju rezultate proteinske ekspresije, profili stanične CHL-1 pomalo su zbunjujući (**Poglavlje 4.5.7, Slika 4.36**). Dok u uvjetima bez tretmana obje, kontrolna i rezistentna linija imaju veći dio stanične populacije s aktivnim signalnim putem MAPK/PI3K, dodatkom tretmana taj se učinak gubi te veći dio populacije postaje inaktivan. Iako se rezultati slažu s onima prethodno opaženima s GANT61, izgleda da učinak nije specifičan s obzirom da i ostali spojevi uzrokuju smanjenje stanične populacije s aktivnim MAPK/PI3K.

U svrhu opisivanja interakcije HH-GLI i RAS/RAF/MAPK u rezistenciji, u ovom istraživanju objedinjena su dva istraživačka pristupa, razvoj rezistentnih staničnih linija te identifikacija transkripcijskih meta proteina GLI. Iz tog razloga, analizirana je genska ekspresija manjeg panela gena koji predstavljaju potencijalne mete proteina GLI na uspostavljenim rezistentnim staničnim linijama (**Poglavlje 4.6, Slike 4.40 i 4.41**). U rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 vidljivo je smanjenje ekspresije gena *SPRY4*, *DUSP4*, *DUSP7* te *RAB34* u odnosu na kontrolnu liniju. Proteini *SPRY4*, *DUSP4* i *DUSP7* predstavljaju poznate negativne regulatore RAS/RAF/MAPK te s obzirom na pojačanu aktivnost signalnog puta RAS/RAF/MAPK u rezistentnoj liniji, njihova smanjena ekspresija nije iznenađujuća. Gubitak funkcije *DUSP4*

povezuje se s promocijom svojstva tumorskih matičnih stanica te rezistencijom na terapiju (299,300). Kumar i suradnici u svojoj su studiji pokazali da je supresija tumorskog rasta u melanomima s mutacijom u genu *NRAS* posredovana djelovanjem *SPRY4* (301). Protein *RAB34* poznati je regulator ciliogeneze, odnosno formiranja primarne cilije, mikrotubularne strukture iznimno važne za normalno funkcioniranje signalne kaskade HH-GLI. U primarnoj ciliji akumuliraju se komponente HH-GLI te istovremeno na njoj površini ekspimiraju receptori nužni za vezanje liganda (72). Xu i suradnici pokazali su da je aktivnost *RAB34* nužna za rane korake ciliogeneze poput formiranja cilijarnih vezikula, te da se samim time uvjetuje i aktivnost HH-GLI (302). S obzirom na to da je u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 detektirana smanjena ekspresija komponenti HH-GLI, postavlja se pitanje je li smanjena ekspresija *RAB34* potencijalni uzrok ove pojave. Smanjena ekspresija *RAB34* povezuje se sa smanjenom ciliogenezom koja za posljedicu može imati nefunkcioniranje HH-GLI, što je naposljetku moglo dovesti do kompenzacijske aktivacije *RAS/RAF/MAPK*. U rezistentnoj staničnoj liniji divljeg tipa, CHL-1 opažen je suprotan trend genske ekspresije negativnih regulatora *RAS/RAF/MAPK*. Ekspresija gena *SPRY4*, *DUSP4* i *SPRY2* je u rezistentnoj staničnoj liniji povišena u odnosu na kontrolnu liniju što se također slaže s prethodno uočenom smanjenom ekspresijom komponenti *RAS/RAF/MAPK*. Također je uočena smanjena ekspresija gena *RHEB* koji kodira za protein koji veže GTP, za koji su Karbowiczek i suradnici pokazali da onemogućava heterodimerizaciju proteina *RAS* (303). Ekspresija gena *RAB34* u staničnoj liniji divljeg tipa ostala je nepromijenjena u odnosu na kontrolnu liniju.

S obzirom na to da je protein *RAB34* direktno vezan uz regulaciju HH-GLI preko ciliogeneze, te bi njegova promijenjena ekspresija mogla objasniti druge uočene promjene, daljnji fokus istraživanja stavljen je na navedeni protein. Promjene uočene na genskoj razini, također su potvrđene i na razini proteina. U rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 uočena je smanjena ekspresija *RAB34* u odnosu na kontrolu, dok u staničnoj liniji divljeg tipa CHL-1 nema razlike u ekspresiji među linijama (**Poglavlje 4.6.1, Slika 4.42**). Nadalje, provjerena je sposobnost formiranja cilija u staničnim linijama kako bi se vidjelo izaziva li promijenjena ekspresija *RAB34* očekivane posljedice na ciliogenezu. U rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 kod koje je uočena smanjena ekspresija *RAB34* detektirana je i smanjena sposobnost formiranja primarnih cilija za 54,37 % u odnosu na kontrolnu liniju, dok u staničnoj liniji divljeg tipa CHL-1 primarne cilije uopće nisu detektirane. Udio stanica koje formiraju cilije u staničnoj liniji Mel 224 malen je u odnosu na ukupnu populaciju, no za melanome je općenito karakterističan gubitak primarnih cilija te se smatra da gubitak cilija prati stupanj malignosti (83). Kada se uzme u obzir ta činjenica, sama detekcija primarnih cilija već predstavlja važan rezultat. Vrlo često u tumorima dolazi do gubitka primarnih cilija zbog povišene ekspresije negativnih regulatora ciliogeneze poput kinaze *AURKA*. U karcinomu jajnika pokazano je da povišena ekspresija *AURKA*

uzrokuje smanjenu ciliogenezu što za posljedicu ima utišavanje aktivnosti HH-GLI i promociju karcinogeneze (304). Smanjena ciliogeneza mogla bi objasniti pad aktivnosti HH-GLI, no vjerojatno se radi o pojavi koja dodatno pojačava efekt opetovanih tretmana GANT61. Stanice potencijalno mogu smanjiti aktivnost proteina GLI kako bi zaobišle djelovanje GANT61, dok smanjena ciliogeneza onemogućava akumulaciju ostalih uzvodnih komponenti HH-GLI čime se dodatno smanjuje aktivnost signalnog puta. Zanimljivo, stanična linija CHL-1 ne formira primarne cilije iako je prethodno detektirana ekspresija RAB34 što ukazuje na to da osim ciliogeneze, RAB34 regulira i druge stanične procese neovisne o ciliogenezi. Kuonen i suradnici su u nedavnom istraživanju pokazali da promjena u signalnoj aktivnosti s HH-GLI na RAS/RAF/MAPK dovodi do gubitka primarnih cilija u bazocelularnim karcinomima rezistentnim na vismodegib, inhibitor koreceptora SMO (305). S obzirom na sličnost naših opažanja s prethodnom studijom, postavlja se pitanje dolazi li u slučaju staničnog modela rezistencije na GANT61 do sličnog fenomena.

Ciliogeneza je proces koji je usko vezan s drugim staničnim procesima, stoga je ispitana regulacija autofagije i staničnog ciklusa u uspostavljenim staničnim linijama. Pri bazalnim uvjetima, u rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 vidljiva je povećana ekspresija aktivne forme biljega LC3B, LC3BII koja se može naći u membrani autofagosoma (**Poglavlje 4.6.3, Slike 4.46 – 4.48**) Tretman bafilomicinom A1, inhibitorom autofagije izaziva očekivani učinak nakupljanja LC3BII u obje linije, kontrolnoj i rezistentnoj. Suprotno tome, tretman rapamicinom, aktivatorom autofagije, izaziva očekivanu indukciju autofagije i odsutnost biljega LC3BII. Na temelju tih rezultata, vidimo da se autofagija funkcionira na očekivani način kada se inducira odnosno inhibira, no tek kombinirani tretman bafilomicinom A1 i rapamicinom ukazuje na razliku u efikasnosti autofagije. Nakon kombiniranog tretmana u obje se linije može detektirati nakupljanje LC3BII, no ono je mnogo izraženije u kontrolnoj liniji, što upućuje na slabije funkcioniranje autofagije u odnosu na rezistentnu liniju. Poznato je da terapeutici induciraju staničnu smrt, stoga tumorske stanice vrlo često dodatno induciraju autofagiju kako bi uklonile oštećene stanične komponente i izbjegle staničnu smrt (306). Zato se inhibitori autofagije poput arsenovog trioksida preporučuju kao dodatna strategija u prevenciji kemorezistencije (307). Navedena studija Zhang i suradnika potencijalno može objasniti zašto je rezistentna linija Mel 224 nakon perioda netretiranja postala ponovo osjetljiva na arsenov trioksid unatoč prvotnoj kratkotrajnoj rezistenciji. Postoje brojne studije koje naglašavaju dvojnju ulogu autofagije u karcinogenezi te ističu da i reducirana autofagija može promovirati malignost stanica. Interakcija ciliogeneze i autofagije kompleksna je te se u znanstvenoj zajednici mogu pronaći oprečna mišljenja. Cuervo i suradnici pokazali su da autofagija negativno regulira ciliogenezu tako što potiče degradaciju proteina esencijalnih za formiranje cilija (69). Isto tako postoje studije koje pokazuju pozitivnu regulaciju između ciliogeneze i



autofagije, poput one Tang i suradnika koji su pokazali da se autofagijom mogu degradirati negativni regulatori ciliogeneze (68). Rezultati naše studije uklapaju se u negativnu regulaciju ciliogeneze autofagijom. Ovu hipotezu dodatno potvrđuje studija Wang i suradnika u kojoj su pokazali da aktivacija HH-GLI negativno regulira autofagiju, te da se inhibicijom HH-GLI može povratiti ponovna aktivnost autofagije. Ista grupa pokazala je da GANT61, inhibitor proteina GLI, dodatno inducira autofagiju te da se inhibicijom autofagije povećava efikasnost tretmana GANT61 (308,309). Kada se uzme u obzir da su rezistentne stanične linije uspostavljene opetovanim tretiranjem GANT61, postavlja se pitanje je li promjena stanične signalizacije s HH-GLI na RAS/RAF/MAPK uzrokovala gubitak primarnih cilija i dovela do povećane aktivnosti autofagije koja dodatno potiče održavanje takve signalizacije.

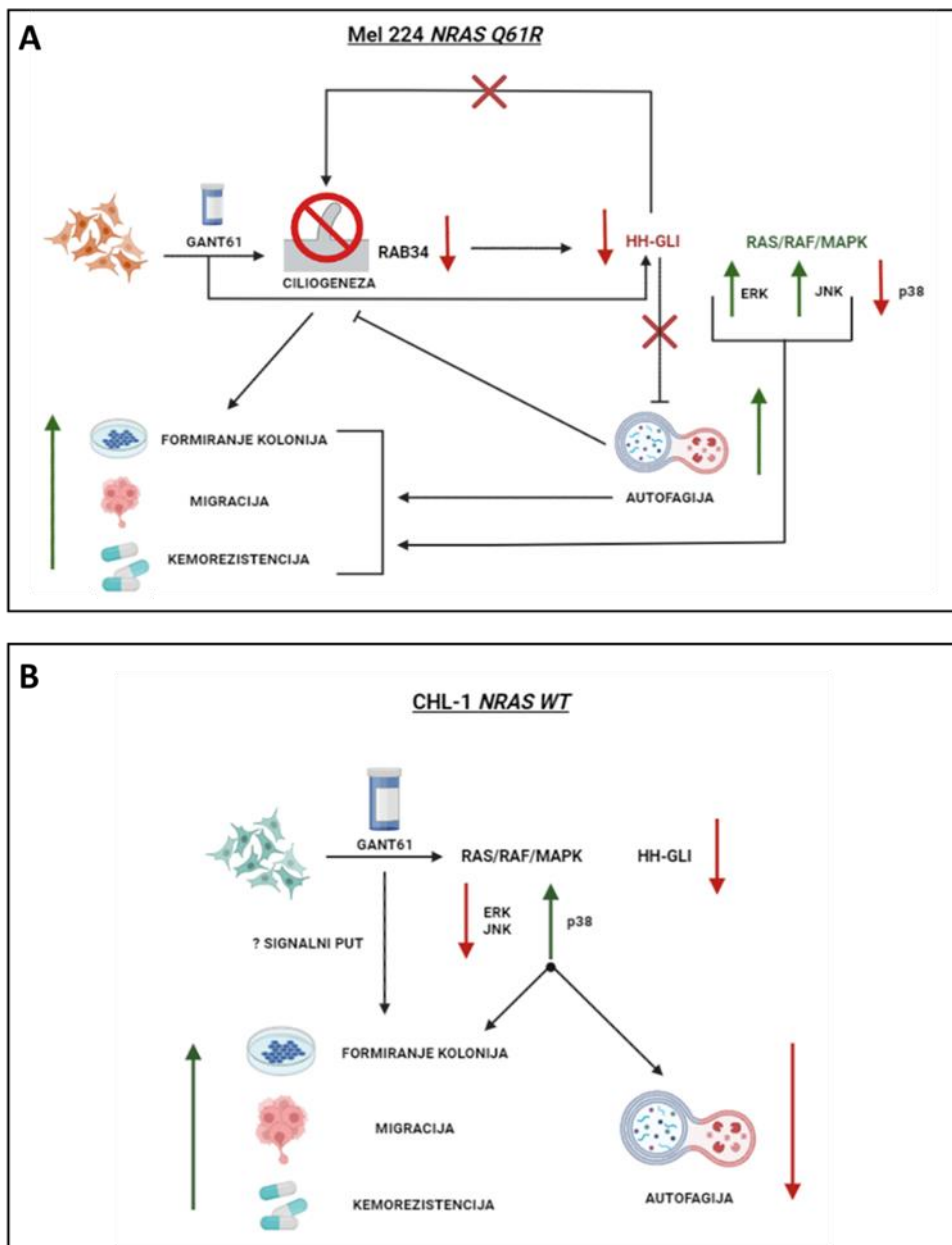
U staničnoj liniji divljeg tipa, CHL-1 vidljiv je suprotan trend u funkcioniranju autofagije. Dok tretman bafilomicinom izaziva očekivani učinak u obje linije, tretman rapamicinom izaziva aktivaciju autofagije isključivo u kontrolnoj liniji. U rezistentnoj liniji unatoč indukciji autofagije, dolazi do nakupljanja LC3BII što upućuje na to da je autofagija manje funkcionalna. Iako prevladava mišljenje da je pojačana aktivnost autofagije protektivna za tumor, mnoge studije pokazuju suprotno što potvrđuje koliko je proces autofagije kompleksan. S obzirom na prethodno uočena izražena invazivna svojstva rezistentne linije CHL-1 postavlja se pitanje ide li u ovom slučaju redukcija autofagije u prilog daljnjoj karcinogenezi. Vega Rubin de Celis i suradnici pokazali su da smanjena autofagija doprinosi agresivnosti tumorskih stanica u HER2 pozitivnim tumorima dojke (310). Kao i kod rezistentne stanične linije Mel 224, ekspresija komponenti HH-GLI snižena je i u rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1, no trend u aktivnosti autofagije je suprotan. Već je spomenuto da HH-GLI može negativno regulirati autofagiju, no u slučaju stanične linije CHL-1 možemo pretpostaviti da su promjene uočene u autofagiji neovisne o HH-GLI. Promjene bi potencijalno mogle objasniti prethodno uočena pojačana ekspresija kinaze p38 u rezistentnoj staničnoj liniji CHL-1. Paillas i suradnici pokazali su da pojačana aktivnost p38 promovira svojstva matičnih stanica i popravak DNA, dok potiče inhibiciju autofagije i stanične smrti čime doprinosi razvoju kemorezistencije (311).

Analiza staničnog ciklusa pokazala je da u obje stanične linije tretman GANT61 uzrokuje očekivano blokiranje staničnog ciklusa u fazama G0/G1 u parentalnim linijama. Poznato je da GANT61 između ostalih efekata izaziva i zastoj u fazi G1 staničnog ciklusa (312). Kod obje rezistentne linije taj učinak je vidljiv pri većim dozama spoja te nakon duljeg vremena (48h). Kod stanične linije Mel 224 dulji tretman inhibitorom GANT61 dovodi do pojave populacije sub-G1, što indicira aktivaciju apoptoze. Populacija stanica sub-G1 izdvaja se kao zasebna populacija zbog fragmentirane DNA male molekulske mase te se iz tog razloga smatraju staničnom populacijom koja ulazi u proces apoptoze (313). Kod rezistentne stanične linije CHL-1 takav učinak može se vidjeti pri višim dozama spoja GANT61 (**Poglavlje 4.5.8, Slike**

**4.37 – 4.39).** U odnosu na kontrolne linije, populacija sub-G1 se u obje rezistentne stanične linije javlja tek s vremenskim odmakom te pri višim koncentracijama što se može povezati sa stjecanjem rezistencije. Također, u svim staničnim linijama opažena je populacija višejezgrenih stanica koje su rezultat genomske nestabilnosti zbog koje dolazi do nekontrolirane diobe i fuzije stanica (273). Pojava višejezgrenih stanica pokazuje kako tumorske stanične linije same po sebi predstavljaju genomski nestabilan sustav, no vidljivo je kako tretmani kemijskim spojevima mogu dodatno inducirati tu pojavu.

Kada se sumiraju dobiveni rezultati, vidljivo je da iako su razvijene dvije stanične linije rezistentne na isti spoj, GANT61, potencijalni mehanizmi koji doprinose razvoju rezistencije nisu jednaki. Također je utvrđeno da rezistencija na GANT61 ne dovodi do križne rezistencije na druge lijekove koji djeluju na signalne puteve HH-GLI i RAS/RAF/MAPK, kao što su vismodegib, sonidegib i salirasib. Uočeni različiti mehanizmi mogu se potencijalno objasniti različitim mutacijskim statusom gena *NRAS*, no u svakom slučaju bi uočene promjene bilo dobro potvrditi na više staničnih linija kako bi se isključio utjecaj specifičnosti određene stanične linije. Dobiveni rezultati imaju veliku vrijednost u razumijevanju procesa rezistencije jer u do sada neopisanom kontekstu dovode u vezu signalne puteve HH-GLI i RAS/RAF/MAPK, osobito u slučaju stanične linije s mutacijom u genu *NRAS*. Bolje razumijevanje interakcija može rezultirati razvojem naprednijih strategija kombinirane terapije čime bi se preduhitрили alternativni mehanizmi kojima tumorska stanica izbjegava djelovanje terapeutika. Uočene razlike između staničnih linija ukazuju na potencijal razvoja selektivne terapije koja bi bila od osobite koristi za užu grupu pacijenata oboljelih od melanoma s obzirom na mutacijski status gena *NRAS*. Takva terapija bila bi od osobite važnosti jer se većina terapijskih strategija fokusira na protein BRAF, pomalo zanemarujući skupinu melanoma s mutacijama u drugim genima. U slučaju stanične linije s mutacijom u genu *NRAS*, primarna cilija predstavlja potencijalnu poveznicu između signalnih puteva RAS/RAF/MAPK. Daljnja istraživanja koja bi se temeljila na obnavljanju primarnih cilija te opisivanju regulacije ciliogeneze putem RAS/RAF/MAPK dala bi dodatani uvid u cijelu signalizaciju. Grupa Riobo del Galdo već je pokazala da obnova primarnih cilija u gliomima nakon inhibicije negativnih regulatora ciliogeneze, dovodi do reverzije karcinogenih svojstava (314). Kod stanične linije divljeg tipa CHL-1, vidljivo je da je signalizacija bitno drugačija upućujući na to da uz krak p38 neki drugi signalni put neovisan o HH-GLI i RAS/RAF/MAPK sudjeluje u rezistenciji. Buduće studije bi se trebale orijentirati na opisivanje utjecaja inhibicije p38 na stanice te identifikaciju signalnog partnera koji doprinosi razvoju invazivnih karakteristika stanica.

Na temelju rezultata ovog istraživanja predložen je sljedeći model stanične signalizacije koji potencijalno doprinosi razvoju rezistencije u staničnim linijama Mel 224 (*NRAS Q61R*) i CHL-1 (*NRAS WT*) (Slika 5.1). Opetovani tretmani GANT61 su u staničnoj liniji Mel 224 doveli do smanjene ciliogeneze koja može biti direktna posljedica smanjene ekspresije proteina RAB34, no mora se uzeti u obzir da postoji još veliki broj pozitivnih regulatora ciliogeneze čija ekspresija u ovoj studiji nije ispitana. Smanjena ciliogeneza je samim time mogla uzrokovati dodatno utišavanje signalnog puta HH-GLI koji kontrolira čitav niz staničnih procesa esencijalnih u karcinogenezi i transkripcijski aktivira RAB34 koji je od esencijalne važnosti za ciliogenezu. Opetovano tretiranje GANT61 može direktno dovesti do smanjene aktivnosti HH-GLI kako bi stanice stekle selektivnu prednost i zaobišle djelovanje spoja. Ova studija predlaže model povratne petlje između HH-GLI i ciliogeneze koji u konačnici rezultira smanjenom aktivnošću HH-GLI i ciliogenezom. Kako bi se održala funkcija esencijalnih staničnih procesa, došlo je do povećane kompenzacijske aktivnosti signalnog puta RAS/RAF/MAPK (krakovi ERK i JNK). Smanjena ciliogeneza ide u prilog razvoju invazivnih karakteristika stanica, poput migracije i sposobnosti formiranja kolonija koju dodatno potiče povećana aktivnost RAS/RAF/MAPK. S obzirom na poznatu negativnu regulaciju autofagije putem HH-GLI, smanjena aktivnost HH-GLI je između ostalog mogla dovesti do pojačane autofagije koja dodatno promovira smanjeno formiranje primarnih cilija. Povećana autofagija sama je za sebe mogla biti direktan odgovor na opetovane tretmane GANT61, no smanjena aktivnost HH-GLI u svakom slučaju ide u prilog njenoj jačoj aktivnosti. U slučaju stanične linije CHL-1 opetovano tretiranje GANT61 dovelo je do smanjene aktivnosti HH-GLI čime se potencijalno pokušava zaobići djelovanje spoja. Smanjenje aktivnosti HH-GLI, prate i krakovi ERK i JNK signalnog puta RAS/RAF/MAPK, no povećana aktivnost kraka p38 potencijalno potiče razvoj invazivnih karakteristika te smanjuje autofagiju. Uz p38 pretpostavlja se da neki drugi signalni put kompenzira smanjenu aktivnost HH-GLI te krakove ERK i JNK.



**Slika 5.1.** Potencijalna stanična signalizacija uslijed stjecanja rezistencije na GANT61 u staničnim linijama Mel 224 (A) i CHL-1 (B). U staničnoj liniji Mel 224 opetovano tretiranje GANT61 dovodi do smanjene ciliogeneze koja uzrokuje smanjenu aktivnost HH-GLI te kompenzacijsku aktivaciju RAS/RAF/MAPK (ERK i JNK). Smanjena aktivnost HH-GLI dodatno pogoduje smanjenoj ciliogenezi jer transkripcijski regulira regulator ciliogeneze, RAB34. Smanjena ciliogeneza i povećana aktivnost RAS/RAF/MAPK promoviraju invazivna svojstva stanica, dok smanjena aktivnost HH-GLI omogućava povećanu autofagiju koja dodatno inhibira ciliogenezu. U staničnoj liniji CHL-1 opetovano tretiranje dovodi do smanjene aktivnosti HH-GLI i RAS/RAF/MAPK s iznimkom kraka p38 koji uz pomoć neidentificiranog signalnog puta potiče invazivna svojstva i smanjenu autofagiju.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata koji su dobiveni u ovom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Signalni put Hedgehog-GLI aktivan je u staničnim linijama melanoma.
2. Ekspresija proteina GLI3 je najsnažnija i najstabilnija od sva tri proteina GLI u staničnim linijama melanoma.
3. Stanične linije melanoma pokazuju smanjeno preživljenje nakon tretmana inhibitorom proteina GLI, GANT61.
4. Metodom ChIP-seq identificirane su specifične i preklapajuće mete proteina GLI te je utvrđeno da najveći broj potencijalnih transkripcijskih meta ima protein GLI2 (66,16 %).
5. Najveći dio potencijalnih transkripcijskih meta povezan je s malignim oboljenjima.
6. Od identificiranih potencijalnih transkripcijskih meta, 21 gen je bio usko povezan s regulacijom signalnog puta RAS/RAF/MAPK.
7. Kao potencijalna meta proteina GLI čija bi se uloga u melanomu trebala dalje istražiti izdvaja se *RAB34*.
8. Uspješno su uspostavljene i validirane stanične linije Mel 224 i CHL-1 rezistentne na GANT61.
9. Rezistencija na GANT61 ne dovodi do križne rezistencije na lijekove poput vismodegiba, sonidegiba i salirasiba.
10. Rezistentne stanične linije su uslijed stjecanja otpornosti promijenile morfološki fenotip iz epitelnog u mezenhimalni.
11. Obje rezistentne stanične linije pokazuju sniženu proteinsku ekspresiju komponenti HH-GLI.
12. Rezistentna stanična linija Mel 224 pokazuje pojačanu aktivnost krakova ERK i JNK signalnog puta RAS/RAF/MAPK, dok rezistentna stanična linija CHL-1 pokazuje pojačanu aktivnost kraka p38 signalnog puta RAS/RAF/MAPK.
13. Obje rezistentne stanične linije pokazuju povećanje invazivnih svojstava poput migracije i sposobnosti formiranja kolonija u odnosu na parentalne linije.
14. Rezistentna stanična linija Mel 224 pokazuje smanjenu ekspresiju regulatora ciliogeneze, *RAB34* te ima smanjenu sposobnost formiranja cilija u odnosu na kontrolnu liniju.
15. U rezistentnoj staničnoj liniji Mel 224 povećana je aktivnost autofagije, dok je ona u staničnoj liniji CHL-1 smanjena.
16. Iako su uspostavljene rezistentne stanične linije rezistentne na identičan spoj, GANT61, potencijalni mehanizmi koji doprinose razvoju rezistencije te odnos aktivnosti HH-GLI i RAS/RAF/MAPK među njima se razlikuje.

## 7. LITERATURA

1. Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*. 2014 Nov 21;346(6212):945–9.
2. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3099–112.
3. Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature*. 2014 Mar 6;507(7490):109–13.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7–30.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019., Bilten 44, Zagreb, 2021. (44):37.
6. Melanoma skin cancer survival statistics [Internet]. Cancer Research UK. 2015 [cited 2022 Aug 22]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/melanoma-skin-cancer/survival>
7. Tímár J, Ladányi A. [Molecular pathology of skin melanoma]. *Magy Onkol*. 2022 Jun 20;66(2):101–8.
8. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan;71(1):7–33.
9. Law MH, Macgregor S, Hayward NK. Melanoma genetics: recent findings take us beyond well-traveled pathways. *J Invest Dermatol*. 2012 Jul;132(7):1763–74.
10. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, Arance A, Alos L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells*. 2021 Sep 5;10(9):2320.
11. Shtivelman E, Davies MQA, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, et al. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget*. 2014 Apr 15;5(7):1701–52.
12. Guo W, Wang H, Li C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Dec 20;6(1):424.
13. Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1297–304.
14. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2019 Aug 15;381(7):626–36.
15. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Sep;17(9):1248–60.

16. Teixidó C, González-Cao M, Karachaliou N, Rosell R. Predictive factors for immunotherapy in melanoma. *Ann Transl Med.* 2015 Sep;3(15):208.
17. Chai JY, Sugumar V, Alshanon AF, Wong WF, Fung SY, Looi CY. Defining the Role of GLI/Hedgehog Signaling in Chemoresistance: Implications in Therapeutic Approaches. *Cancers (Basel).* 2021 Sep 23;13(19):4746.
18. Sturgill TW, Ray LB. Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Jan 29;134(2):565–71.
19. Nakamura KD, Martinez R, Weber MJ. Tyrosine phosphorylation of specific proteins after mitogen stimulation of chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1983 Mar;3(3):380–90.
20. Pua LJW, Mai CW, Chung FFL, Khoo ASB, Leong CO, Lim WM, et al. Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 20;23(3):1108.
21. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):424–30.
22. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1773(8):1161–76.
23. Eblen ST. Extracellular-Regulated Kinases: Signaling From Ras to ERK Substrates to Control Biological Outcomes. *Adv Cancer Res.* 2018;138:99–142.
24. Yang Y, Zhu X, Jia X, Hou W, Zhou G, Ma Z, et al. Phosphorylation of Msx1 promotes cell proliferation through the Fgf9/18-MAPK signaling pathway during embryonic limb development. *Nucleic Acids Res.* 2020 Nov 18;48(20):11452–67.
25. Iroegbu JD, Ijomone OK, Femi-Akinlosotu OM, Ijomone OM. ERK/MAPK signalling in the developing brain: Perturbations and consequences. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021 Dec;131:792–805.
26. Umoh NA, Walker RK, Millis RM, Al-Rubaiee M, Gangula PR, Haddad GE. Calcitonin Gene-Related Peptide Regulates Cardiomyocyte Survival through Regulation of Oxidative Stress by PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *Ann Clin Exp Hypertens.* 2014 Jan;2(1):1007.
27. Chen J, Aguilera G. Vasopressin protects hippocampal neurones in culture against nutrient deprivation or glutamate-induced apoptosis. *J Neuroendocrinol.* 2010 Oct;22(10):1072–81.
28. Xu T, Wang NS, Fu LL, Ye CY, Yu SQ, Mei CL. Celecoxib inhibits growth of human autosomal dominant polycystic kidney cyst-lining epithelial cells through the VEGF/Raf/MAPK/ERK signaling pathway. *Mol Biol Rep.* 2012 Jul;39(7):7743–53.
29. Holmström TH, Schmitz I, Söderström TS, Poukkula M, Johnson VL, Chow SC, et al. MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J.* 2000 Oct 16;19(20):5418–28.
30. Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, Schmahl G, Corral L, Ritterbach J, et al. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia.* 1999 Jan;13(1):32–7.

31. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004 Oct;6(4):313–9.
32. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*. 2002 Jun 14;109(6):707–18.
33. Miltenberger RJ, Farnham PJ, Smith DE, Stommel JM, Cornwell MM. v-Raf activates transcription of growth-responsive promoters via GC-rich sequences that bind the transcription factor Sp1. *Cell Growth Differ*. 1995 May;6(5):549–56.
34. Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C. p38 $\alpha$  MAPK pathway: a key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 7;20(29):9744–58.
35. Lei YY, Wang WJ, Mei JH, Wang CL. Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(20):8539–48.
36. Karasarides M, Chiloeches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene*. 2004 Aug 19;23(37):6292–8.
37. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795–801.
38. Ingham PW. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*. 2001 Dec;15(23):3059–87.
39. Kinzler K, Bigner S, Bigner D, Trent J, Law M, O'Brien S, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. 1987 Apr 3;236(4797):70–3.
40. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Molecular and Cellular Biology*. 1990;10(2):634–42.
41. Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, et al. The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol*. 1988 Aug;8(8):3104–13.
42. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science*. 2007 Jul;317(5836):372–6.
43. Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, Basset-Seguín N, Modrusan Z, Januario T, et al. Genomic analysis of smoothed inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2015 Mar 9;27(3):327–41.
44. Luchetti G, Sircar R, Kong JH, Nachtergaele S, Sagner A, Byrne EF, et al. Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling. *eLife* [Internet]. 2016 Oct 5 [cited 2018 Jul 16];5. Available from: <https://elifesciences.org/articles/20304>
45. Shi Q, Han Y, Jiang J. Suppressor of fused impedes Ci/Gli nuclear import by opposing Trn/Kap $\beta$ 2 in Hedgehog signaling. *J Cell Sci*. 2014 Jan 10;jcs.142828.
46. Huntzicker EG. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes & Development*. 2006 Jan;20(3):276–81.



47. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(9):3365–77.
48. Takenaka K, Kise Y, Miki H. GSK3 [beta] positively regulates Hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;353(2):501–8.
49. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*. 2009 Sep;9(7):873–86.
50. Zhou M, Jiang J. Gli Phosphorylation Code in Hedgehog Signal Transduction. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:846927.
51. Niewiadomski P, Niedziółka SM, Markiewicz Ł, Uśpieński T, Baran B, Chojnowska K. Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells*. 2019 Feb 11;8(2):E147.
52. Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *European Journal of Cancer*. 2006;42(4):437–45.
53. Atwood SX, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE. GLI activation by atypical protein kinase C  $\iota/\lambda$  regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature*. 2013 Feb;494(7438):484–8.
54. Malatesta M, Steinhauer C, Mohammad F, Pandey DP, Squatrito M, Helin K. Histone acetyltransferase PCAF is required for Hedgehog-Gli-dependent transcription and cancer cell proliferation. *Cancer Res*. 2013 Oct 15;73(20):6323–33.
55. Lazzari E, Mondala PK, Santos ND, Miller AC, Pineda G, Jiang Q, et al. Alu-dependent RNA editing of GLI1 promotes malignant regeneration in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2017 Dec 4;8(1):1922.
56. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol*. 2007 Sep;17(9):438–47.
57. Aberger F, Ruiz i Altaba A. Context-dependent signal integration by the GLI code: The oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014 Sep;33:93–104.
58. Bloodgood RA. From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. *The primary cilium*. *Methods Cell Biol*. 2009;94:3–52.
59. Rosenbaum JL, Witman GB. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Nov;3(11):813–25.
60. Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol*. 2002 Jun 4;12(11):R378-380.
61. Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Sep;18(9):533–47.
62. Wiegering A, R  ther U, Gerhardt C. The Role of Primary Cilia in the Crosstalk between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Cells*. 2019 Mar 14;8(3):E241.

63. Hao L, Scholey JM. Intraflagellar transport at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Apr 1;122(7):889–92.
64. Czarnecki PG, Shah JV. The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends Cell Biol.* 2012 Apr;22(4):201–10.
65. Sorokin SP. Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen Emphysema Conf.* 1968;11:213–6.
66. Paz J, Lüders J. Microtubule-Organizing Centers: Towards a Minimal Parts List. *Trends Cell Biol.* 2018 Mar;28(3):176–87.
67. Plotnikova OV, Nikonova AS, Loskutov YV, Kozyulina PY, Pugacheva EN, Golemis EA. Calmodulin activation of Aurora-A kinase (AURKA) is required during ciliary disassembly and in mitosis. *Mol Biol Cell.* 2012 Jul;23(14):2658–70.
68. Tang Z, Lin MG, Stowe TR, Chen S, Zhu M, Stearns T, et al. Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature.* 2013 Oct 10;502(7470):254–7.
69. Pampliega O, Orhon I, Patel B, Sridhar S, Díaz-Carretero A, Beau I, et al. Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature.* 2013 Oct 2;502(7470):194–200.
70. Xu Q, Liu W, Liu X, Liu W, Wang H, Yao G, et al. Silibinin negatively contributes to primary cilia length via autophagy regulated by histone deacetylase 6 in confluent mouse embryo fibroblast 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biochem.* 2016 Sep;420(1–2):53–63.
71. Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature.* 2003 Nov 6;426(6962):83–7.
72. Huangfu D, Anderson KV. Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Aug 9;102(32):11325–30.
73. Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes & Development.* 2010 Apr 1;24:670–82.
74. Chen MH, Wilson CW, Li YJ, Law KKL, Lu CS, Gacayan R, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* 2009 Aug 15;23(16):1910–28.
75. Ocbina PJR, Anderson KV. Intraflagellar Transport, Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling: Analysis in Mouse Embryonic Fibroblasts. *Dev Dyn.* 2008 Aug;237(8):2030–8.
76. Breslow DK, Koslover EF, Seydel F, Spakowitz AJ, Nachury MV. An in vitro assay for entry into cilia reveals unique properties of the soluble diffusion barrier. *J Cell Biol.* 2013 Oct 14;203(1):129–47.
77. Han Y, Xiong Y, Shi X, Wu J, Zhao Y, Jiang J. Regulation of Gli ciliary localization and Hedgehog signaling by the PY-NLS/karyopherin- $\beta$ 2 nuclear import system. *PLoS Biol.* 2017 Aug;15(8):e2002063.
78. He M, Subramanian R, Bangs F, Omelchenko T, Liem KF, Kapoor TM, et al. The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment. *Nat Cell Biol.* 2014 Jul;16(7):663–72.

79. Milenkovic L, Weiss LE, Yoon J, Roth TL, Su YS, Sahl SJ, et al. Single-molecule imaging of Hedgehog pathway protein Smoothed in primary cilia reveals binding events regulated by Patched1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 7;112(27):8320–5.
80. Hassounah NB, Nagle R, Saboda K, Roe DJ, Dalkin BL, McDermott KM. Primary cilia are lost in preinvasive and invasive prostate cancer. *PLoS One*. 2013;8(7):e68521.
81. Thoma CR, Frew IJ, Hoerner CR, Montani M, Moch H, Krek W. pVHL and GSK3beta are components of a primary cilium-maintenance signalling network. *Nat Cell Biol*. 2007 May;9(5):588–95.
82. Lee J, Yi S, Won M, Song YS, Yi HS, Park YJ, et al. Loss-of-function of IFT88 determines metabolic phenotypes in thyroid cancer. *Oncogene*. 2018 Aug;37(32):4455–74.
83. Choudhury A, Neumann NM, Raleigh DR, Lang UE. Clinical Implications of Primary Cilia in Skin Cancer. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2020 Jan 29;10(2):233–48.
84. Radford R, Slattery C, Jennings P, Blacque O, Blaque O, Pfaller W, et al. Carcinogens induce loss of the primary cilium in human renal proximal tubular epithelial cells independently of effects on the cell cycle. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Apr 15;302(8):F905-916.
85. Guen VJ, Chavarria TE, Kröger C, Ye X, Weinberg RA, Lees JA. EMT programs promote basal mammary stem cell and tumor-initiating cell stemness by inducing primary ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Dec 5;114(49):E10532–9.
86. Vion AC, Alt S, Klaus-Bergmann A, Szyborska A, Zheng T, Perovic T, et al. Primary cilia sensitize endothelial cells to BMP and prevent excessive vascular regression. *J Cell Biol*. 2018 May 7;217(5):1651–65.
87. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet*. 1996 Nov;14(3):353–6.
88. Hu D, Helms JA. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development*. 1999 Nov;126(21):4873–84.
89. Jia J, Jiang J. Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Apr;63(11):1249–65.
90. Byrd N, Grabel L. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004 Nov;14(8):308–13.
91. Cai H, Li H, Li J, Li X, Li Y, Shi Y, et al. Sonic hedgehog signaling pathway mediates development of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2016 Oct 15;
92. Nielsen SK, Møllgård K, Clement CA, Veland IR, Awan A, Yoder BK, et al. Characterization of primary cilia and Hedgehog signaling during development of the human pancreas and in human pancreatic duct cancer cell lines. *Dev Dyn*. 2008 Aug;237(8):2039–52.
93. Gallego MI, Beachy PA, Hennighausen L, Robinson GW. Differential requirements for shh in mammary tissue and hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*. 2002 Sep 1;249(1):131–9.

94. Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Feb;1830(2):2435–48.
95. Omenetti A, Diehl AM. The Adventures of Sonic Hedgehog in Development and Repair. II. Sonic hedgehog and liver development, inflammation, and cancer. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008 Mar;294(3):G595–8.
96. Buller NVJA, Rosekrans SL, Westerlund J, van den Brink GR. Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology*. 2012 Jun 1;27(3):148–55.
97. St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I, Botchkarev VA, Li J, Danielian PS, et al. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol*. 1998 Sep 24;8(19):1058–68.
98. Morrison KM, Miesegaes GR, Lumpkin EA, Maricich SM. Mammalian Merkel cells are descended from the epidermal lineage. *Dev Biol*. 2009 Dec 1;336(1):76–83.
99. Michaud EJ, Yoder BK. The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer Res*. 2006 Jul 1;66(13):6463–7.
100. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Fantasia JE, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nat Genet*. 1996 Jan;12(1):85–7.
101. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
102. Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(23):9055–67.
103. Kump E, Ji J, Wernli M, Häusermann P, Erb P. Gli2 upregulates cFlip and renders basal cell carcinoma cells resistant to death ligand-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2008 Jun 19;27(27):3856–64.
104. Katoh. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (Review). *Int J Mol Med [Internet]*. 1998; Available from: [http://www.spandidos-publications.com/ijmm/article.jsp?article\\_id=ijmm\\_22\\_3\\_271](http://www.spandidos-publications.com/ijmm/article.jsp?article_id=ijmm_22_3_271)
105. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguat V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Apr 3;104(14):5895–900.
106. Li ZJ, Mack SC, Mak TH, Angers S, Taylor MD, Hui CC. Evasion of p53 and G2/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma. *Oncogene*. 2014 May 15;33(20):2674–80.
107. Das S, Harris LG, Metge BJ, Liu S, Riker AI, Samant RS, et al. The hedgehog pathway transcription factor GLI1 promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(34):22888.
108. Nicolis SK. Cancer stem cells and ‘stemness’ genes in neuro-oncology. *Neurobiol Dis*. 2007 Feb;25(2):217–29.
109. Santini R, Vinci MC, Pandolfi S, Penachioni JY, Montagnani V, Olivito B, et al. HEDGEHOG-GLI Signaling Drives Self-Renewal and Tumorigenicity of Human Melanoma-Initiating Cells. *STEM CELLS*. 2012 Sep 1;30(9):1808–18.

110. Sabol M, Trnski D, Musani V, Ozretić P, Levanat S. Role of GLI Transcription Factors in Pathogenesis and Their Potential as New Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Aug 29 [cited 2018 Oct 12];19(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6163343/>
111. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018 Feb 20;18(1):8–20.
112. Pandolfi S, Montagnani V, Lapucci A, Stecca B. HEDGEHOG/GLI-E2F1 axis modulates iASPP expression and function and regulates melanoma cell growth. *Cell Death and Differentiation* [Internet]. 2015 May 29 [cited 2015 Nov 2]; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cdd.2015.56>
113. Chai JY, Sugumar V, Alshawsh MA, Wong WF, Arya A, Chong PP, et al. The Role of Smoothened-Dependent and -Independent Hedgehog Signaling Pathway in Tumorigenesis. *Biomedicines*. 2021 Sep 10;9(9):1188.
114. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*. 2008 Aug;455(7211):406–10.
115. Grund-Gröschke S, Ortner D, Szenes-Nagy AB, Zaborsky N, Weiss R, Neureiter D, et al. Epidermal activation of Hedgehog signaling establishes an immunosuppressive microenvironment in basal cell carcinoma by modulating skin immunity. *Mol Oncol*. 2020 Sep;14(9):1930–46.
116. Guimaraes VSN, Vidal MTA, de Faro Valverde L, de Oliveira MG, de Oliveira Siquara da Rocha L, Coelho PLC, et al. Hedgehog pathway activation in oral squamous cell carcinoma: cancer-associated fibroblasts exhibit nuclear GLI-1 localization. *J Mol Histol*. 2020 Dec;51(6):675–84.
117. Kuromi T, Matsushita M, Iwasaki T, Nonaka D, Kuwamoto S, Nagata K, et al. Association of expression of the hedgehog signal with Merkel cell polyomavirus infection and prognosis of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2017;69:8–14.
118. Dunjic M, Lukic N, Djordjevic B, Uzelac B, Ostojic N, Supic G. GLI-1 polymorphisms of Hedgehog pathway as novel risk and prognostic biomarkers in melanoma patients. *Melanoma Res*. 2022 Feb 1;32(1):11–7.
119. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* Patched in the Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996;85(6):841–51.
120. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui C chung, Mainprize TG, Zhang X, et al. Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*. 2002 Jul;31(3):306–10.
121. Atwood SX, Sarin KY, Whitson RJ, Li JR, Kim G, Rezaee M, et al. Smoothened variants explain the majority of drug resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2015 Mar 9;27(3):342–53.
122. Couvé-Privat S, Le Bret M, Traiffort E, Queille S, Coulombe J, Bouadjar B, et al. Functional analysis of novel sonic hedgehog gene mutations identified in basal cell carcinomas from xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res*. 2004 May 15;64(10):3559–65.

123. Loh M, Liem N, Vaithilingam A, Lim PL, Sapari NS, Elahi E, et al. DNA methylation subgroups and the CpG island methylator phenotype in gastric cancer: a comprehensive profiling approach. *BMC Gastroenterology*. 2014 Mar 28;14:55.
124. Song Y, Zhang J, Tian T, Fu X, Wang W, Li S, et al. SET7/9 inhibits oncogenic activities through regulation of Gli-1 expression in breast cancer. *Tumor Biol*. 2016 Jul 1;37(7):9311–22.
125. Cretnik M, Poje G, Musani V, Kruslin B, Ozretic P, Tomas D, et al. Involvement of p16 and PTCH in pathogenesis of melanoma and basal cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2009 Apr;34(4):1045–50.
126. Wang N, Li P, Liu W, Wang N, Lu Z, Feng J, et al. miR-141-3p suppresses proliferation and promotes apoptosis by targeting GLI2 in osteosarcoma cells. *Oncol Rep*. 2018 Feb;39(2):747–54.
127. Zhang Y, Chen Z, Li MJ, Guo HY, Jing NC. Long non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 regulates the expression of Gli2 by miR-202 to strengthen gastric cancer progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Jan 1;85:264–71.
128. Pietrobono S, Gagliardi S, Stecca B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothened. *Front Genet*. 2019 Jun 12;10:556.
129. Riobó NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 21;103(12):4505–10.
130. Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, et al. Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med*. 2010 Sep 29;2(51):51ra70.
131. Dennler S, André J, Alexaki I, Li A, Magaldo T, ten Dijke P, et al. Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):6981–6.
132. Dennler S, André J, Verrecchia F, Mauviel A. Cloning of the human GLI2 Promoter: transcriptional activation by transforming growth factor-beta via SMAD3/beta-catenin cooperation. *J Biol Chem*. 2009 Nov 13;284(46):31523–31.
133. Nye MD, Almada LL, Fernandez-Barrena MG, Marks DL, Elsawa SF, Vrabel A, et al. The transcription factor GLI1 interacts with SMAD proteins to modulate transforming growth factor  $\beta$ -induced gene expression in a p300/CREB-binding protein-associated factor (PCAF)-dependent manner. *J Biol Chem*. 2014 May 30;289(22):15495–506.
134. Neill GW, Ghali LR, Green JL, Ikram MS, Philpott MP, Quinn AG. Loss of protein kinase Calpha expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 in basal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Aug 1;63(15):4692–7.
135. Cai Q, Li J, Gao T, Xie J, Evers BM. Protein Kinase C $\delta$  Negatively Regulates Hedgehog Signaling by Inhibition of Gli1 Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Jan 23;284(4):2150–8.
136. Larsen LJ, Møller LB. Crosstalk of Hedgehog and mTORC1 Pathways. *Cells*. 2020 Oct 18;9(10).
137. Li YH, Luo J, Mosley YYC, Hedrick VE, Paul LN, Chang J, et al. AMP-Activated Protein Kinase Directly Phosphorylates and Destabilizes Hedgehog Pathway Transcription Factor GLI1 in Medulloblastoma. *Cell Rep*. 2015 Jul 28;12(4):599–609.

138. Zhang R, Huang SY, Ka-Wai Li K, Li YH, Hsu WH, Zhang GJ, et al. Dual degradation signals destruct GLI1: AMPK inhibits GLI1 through  $\beta$ -TrCP-mediated proteasome degradation. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):49869–81.
139. Teperino R, Amann S, Bayer M, McGee SL, Loipetzberger A, Connor T, et al. Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell*. 2012 Oct 12;151(2):414–26.
140. Riobo NA, Haines GM, Emerson CP. Protein kinase C-delta and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):839–45.
141. Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS Activates Hedgehog Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Mar;282(19):14048–55.
142. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):903–11.
143. Seto M, Ohta M, Asaoka Y, Ikenoue T, Tada M, Miyabayashi K, et al. Regulation of the hedgehog signaling by the mitogen-activated protein kinase cascade in gastric cancer. *Mol Carcinog*. 2009 Aug;48(8):703–12.
144. Liu Z, Li T, Reinhold MI, Naski MC. MEK1-RSK2 contributes to Hedgehog signaling by stabilizing GLI2 transcription factor and inhibiting ubiquitination. *Oncogene*. 2014 Jan 2;33(1):65–73.
145. Bardwell AJ, Wu B, Sarin KY, Waterman ML, Atwood SX, Bardwell L. ERK2 MAP kinase regulates SUFU binding by multisite phosphorylation of GLI1. *Life Sci Alliance*. 2022 Nov;5(11):e202101353.
146. Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberger C, et al. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res*. 2009 Feb 15;69(4):1284–92.
147. Kasper M, Schnidar H, Neill GW, Hanneder M, Klingler S, Blaas L, et al. Selective modulation of Hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(16):6283.
148. Antonucci L, Di Magno L, D’Amico D, Manni S, Serrao SM, Di Pastena F, et al. Mitogen-activated kinase kinase kinase 1 inhibits hedgehog signaling and medulloblastoma growth through GLI1 phosphorylation. *Int J Oncol*. 2018 Nov 19;54(2):505–14.
149. Lu J, Liu L, Zheng M, Li X, Wu A, Wu Q, et al. MEK2 and MEK3 suppress Hedgehog pathway-dependent medulloblastoma by inhibiting GLI1 function. *Oncogene*. 2018 Jul;37(28):3864–78.
150. Tusa I, Gagliardi S, Tubita A, Pandolfi S, Menconi A, Lulli M, et al. The Hedgehog-GLI Pathway Regulates MEK5-ERK5 Expression and Activation in Melanoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 19;22(20):11259.
151. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev*. 2002 Nov 1;16(21):2743–8.

152. Lipinski RJ, Hutson PR, Hannam PW, Nydza RJ, Washington IM, Moore RW, et al. Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. *Toxicol Sci.* 2008 Jul;104(1):189–97.
153. Resh MD, ASCIOLLA JJ, HAUGEN B, Kawasaki M, Yukawa T, Aso K, et al. Hedgehog acyltransferase inhibitors and uses thereof [Internet]. WO2017218874A1, 2017 [cited 2022 Jul 20]. Available from: <https://patents.google.com/patent/WO2017218874A1/en>
154. Owens AE, de Paola I, Hansen WA, Liu YW, Khare SD, Fasan R. Design and Evolution of a Macrocyclic Peptide Inhibitor of the Sonic Hedgehog/Patched Interaction. *J Am Chem Soc.* 2017 Sep 13;139(36):12559–68.
155. Tolani B, Hoang NT, Acevedo LA, Giroux Leprieur E, Li H, He B, et al. Preclinical characterization of therapeutic antibodies targeted at the carboxy-terminus of Sonic hedgehog. *Oncotarget.* 2018 Mar 6;9(18):14311–23.
156. Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P. Vismodegib. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Jun 1;11(6):437–8.
157. Pietrobono S, Stecca B. Targeting the Oncoprotein Smoothed by Small Molecules: Focus on Novel Acylguanidine Derivatives as Potent Smoothed Inhibitors. *Cells.* 2018 Dec 14;7(12):E272.
158. Xie H, Paradise BD, Ma WW, Fernandez-Zapico ME. Recent Advances in the Clinical Targeting of Hedgehog/GLI Signaling in Cancer. *Cells* [Internet]. 2019 Apr 29 [cited 2021 Apr 9];8(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6562674/>
159. Kim J, Aftab BT, Tang JY, Kim D, Lee AH, Rezaee M, et al. Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothed antagonists. *Cancer Cell.* 2013 Jan 14;23(1):23–34.
160. Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell.* 2010 Apr 13;17(4):388–99.
161. Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 May 15;104(20):8455–60.
162. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the hedgehog signaling pathway in cancer: Beyond smoothed. *Oncotarget.* 2015;6(16):13899.
163. Zhang M, Gao L, Ye Y, Li X. Advances in glioma-associated oncogene (GLI) inhibitors for cancer therapy. *Invest New Drugs.* 2022 Apr;40(2):370–88.
164. Calcaterra A, Iovine V, Botta B, Quaglio D, D'Acquarica I, Ciogli A, et al. Chemical, computational and functional insights into the chemical stability of the Hedgehog pathway inhibitor GANT61. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018 Dec;33(1):349–58.
165. Vlčková K, Réda J, Ondrušová L, Krayem M, Ghanem G, Vachtenheim J. GLI inhibitor GANT61 kills melanoma cells and acts in synergy with obatoclax. *International Journal of Oncology.* 2016 Sep 1;49(3):953–60.



166. Benvenuto M, Masuelli L, De Smaele E, Fantini M, Mattera R, Cucchi D, et al. In vitro and in vivo inhibition of breast cancer cell growth by targeting the Hedgehog/Gli pathway with SMO (GDC-0449) or Gli (GANT-61) inhibitors. *Oncotarget*. 2016 Jan 28;7(8):9250–70.
167. Lospinoso Severini L, Quaglio D, Basili I, Ghirga F, Bufalieri F, Caimano M, et al. A Smo/Gli Multitarget Hedgehog Pathway Inhibitor Impairs Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 9;11(10):E1518.
168. Wang ZY, Chen Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2000 Oct;1:101–6.
169. Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA. Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jul 27;107(30):13432–7.
170. You M, Varona-Santos J, Singh S, Robbins DJ, Savaraj N, Nguyen DM. Targeting of the Hedgehog signal transduction pathway suppresses survival of malignant pleural mesothelioma cells in vitro. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2014 Jan 1;147(1):508–16.
171. Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, et al. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):14132–7.
172. Chenna V, Hu C, Pramanik D, Aftab BT, Karikari C, Campbell NR, et al. A Polymeric Nanoparticle Encapsulated Small Molecule Inhibitor of Hedgehog Signaling (NanoHHI) Bypasses Secondary Mutational Resistance to Smoothed Antagonists. *Mol Cancer Ther*. 2012 Jan;11(1):165–73.
173. Cohen Y, Chetrit A, Sirota P, Modan B. Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Medical Oncology*. 1998;15(1):32–6.
174. Trnski D, Sabol M, Gojević A, Martinić M, Ozretić P, Musani V, et al. GSK3 $\beta$  and Gli3 play a role in activation of Hedgehog-Gli pathway in human colon cancer - Targeting GSK3 $\beta$  downregulates the signaling pathway and reduces cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Dec;1852(12):2574–84.
175. Alvarez-Trotta A, Wang Z, Shersher E, Li B, Long J, Lohse I, et al. The bromodomain inhibitor IBET-151 attenuates vismodegib-resistant esophageal adenocarcinoma growth through reduction of Gli signaling. *Oncotarget*. 2020 Aug 18;11(33):3174–87.
176. Dhanyamraju PK, Holz PS, Finkernagel F, Fendrich V, Lauth M. Histone deacetylase 6 represents a novel drug target in the oncogenic Hedgehog signaling pathway. *Mol Cancer Ther*. 2015 Mar;14(3):727–39.
177. Mirza AN, Fry MA, Urman NM, Atwood SX, Roffey J, Ott GR, et al. Combined inhibition of atypical PKC and histone deacetylase 1 is cooperative in basal cell carcinoma treatment. *JCI Insight*. 2017 Nov 2;2(21):97071.
178. Infante P, Mori M, Alfonsi R, Ghirga F, Aiello F, Toscano S, et al. Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors. *EMBO J*. 2015 Jan 13;34(2):200–17.
179. Cabanos HF, Hata AN. Emerging Insights into Targeted Therapy-Tolerant Persister Cells in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 May 28;13(11):2666.

180. Bidet M, Tomico A, Martin P, Guizouarn H, Mollat P, Mus-Veteau I. The Hedgehog receptor patched functions in multidrug transport and chemotherapy resistance. *Mol Cancer Res.* 2012 Nov;10(11):1496–508.
181. Queiroz KCS, Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Aberson HL, Ferreira CV, Peppelenbosch MP, et al. Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells. *Oncogene.* 2010 Dec 2;29(48):6314–22.
182. Signetti L, Elizarov N, Simsir M, Paquet A, Douguet D, Labbal F, et al. Inhibition of Patched Drug Efflux Increases Vemurafenib Effectiveness against Resistant BRAFV600E Melanoma. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 9;12(6).
183. Sun Q, Atzmony L, Zaki T, Peng A, Sugarman J, Choate KA. Clues to primary vismodegib resistance lie in histology and genetics. *J Clin Pathol.* 2020 Oct;73(10):678–80.
184. Nguyen NM, Cho J. Hedgehog Pathway Inhibitors as Targeted Cancer Therapy and Strategies to Overcome Drug Resistance. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 3;23(3):1733.
185. Dijkgraaf GJP, Aliche B, Weinmann L, Januario T, West K, Modrusan Z, et al. Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res.* 2011 Jan 15;71(2):435–44.
186. Yeh-Nayre LA, Malicki DM, Vinocur DN, Crawford JR. Medulloblastoma with excessive nodularity: radiographic features and pathologic correlate. *Case Rep Radiol.* 2012;2012:310359.
187. Yao CD, Haensel D, Gaddam S, Patel T, Atwood SX, Sarin KY, et al. AP-1 and TGF $\beta$  cooperativity drives non-canonical Hedgehog signaling in resistant basal cell carcinoma. *Nat Commun.* 2020 Oct 8;11(1):5079.
188. Zhao X, Ponomaryov T, Ornell KJ, Zhou P, Dabral SK, Pak E, et al. RAS/MAPK Activation Drives Resistance to Smo Inhibition, Metastasis, and Tumor Evolution in Shh Pathway-Dependent Tumors. *Cancer Res.* 2015 Sep 1;75(17):3623–35.
189. Seidl C, Panzitt K, Bertsch A, Brcic L, Schein S, Mack M, et al. MicroRNA-182-5p regulates hedgehog signaling pathway and chemosensitivity of cisplatin-resistant lung adenocarcinoma cells via targeting GLI2. *Cancer Lett.* 2020 Jan 28;469:266–76.
190. Zhao X, Pak E, Ornell KJ, Pazyra-Murphy MF, MacKenzie EL, Chadwick EJ, et al. A Transposon Screen Identifies Loss of Primary Cilia as a Mechanism of Resistance to SMO Inhibitors. *Cancer Discov.* 2017 Dec;7(12):1436–49.
191. Wang K, Chen D, Qian Z, Cui D, Gao L, Lou M. Hedgehog/Gli1 signaling pathway regulates MGMT expression and chemoresistance to temozolomide in human glioblastoma. *Cancer Cell Int.* 2017;17:117.
192. Wei M, Ma R, Huang S, Liao Y, Ding Y, Li Z, et al. Oroxylin A increases the sensitivity of temozolomide on glioma cells by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ /hedgehog pathway under hypoxia. *J Cell Physiol.* 2019 Aug;234(10):17392–404.
193. Zhang R, Ma J, Avery JT, Sambandam V, Nguyen TH, Xu B, et al. GLI1 Inhibitor SRI-38832 Attenuates Chemotherapeutic Resistance by Downregulating NBS1 Transcription in BRAFV600E Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2020;10:241.

194. Capsaicin triggers autophagic cell survival which drives epithelial mesenchymal transition and chemoresistance in bladder cancer cells in an Hedgehog-dependent manner - PubMed [Internet]. [cited 2022 Jul 25]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27367032/>
195. Honorato JR, Hauser-Davis RA, Saggiaro EM, Correia FV, Sales-Junior SF, Soares LOS, et al. Role of Sonic hedgehog signaling in cell cycle, oxidative stress, and autophagy of temozolomide resistant glioblastoma. *J Cell Physiol.* 2020 Apr;235(4):3798–814.
196. Cazet AS, Hui MN, Elsworth BL, Wu SZ, Roden D, Chan CL, et al. Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer. *Nat Commun.* 2018 Jul 24;9(1):2897.
197. Ge S, Tu Y, Hu M. Challenges and Opportunities with Predicting in Vivo Phase II Metabolism via Glucuronidation from in Vitro Data. *Curr Pharmacol Rep.* 2016 Dec;2(6):326–38.
198. Po A, Citarella A, Catanzaro G, Besharat ZM, Trocchianesi S, Gianni F, et al. Hedgehog-Gli signalling promotes chemoresistance through the regulation of ABC transporters in colorectal cancer cells. *Sci Rep.* 2020 Aug 19;10(1):13988.
199. Jiang ZS, Sun YZ, Wang SM, Ruan JS. Epithelial-mesenchymal transition: potential regulator of ABC transporters in tumor progression. *J Cancer.* 2017;8(12):2319–27.
200. Usui T, Sakurai M, Umata K, Elbadawy M, Ohama T, Yamawaki H, et al. Hedgehog Signals Mediate Anti-Cancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Colorectal Cancer Organoid Culture. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 6;19(4):E1098.
201. Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature.* 2011 Nov 23;480(7377):387–90.
202. Kim A, Cohen MS. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert Opin Drug Discov.* 2016 Sep;11(9):907–16.
203. Sharma V, Young L, Cavadas M, Owen K, Reproducibility Project: Cancer Biology. Registered Report: COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Elife.* 2016 Mar 21;5:e11414.
204. Corcoran RB, Settleman J, Engelman JA. Potential therapeutic strategies to overcome acquired resistance to BRAF or MEK inhibitors in BRAF mutant cancers. *Oncotarget.* 2011 Apr;2(4):336–46.
205. Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M, Rutkowski P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 27;21(13):E4576.
206. Dratkiewicz E, Simiczyjew A, Pietraszek-Gremplewicz K, Mazurkiewicz J, Nowak D. Characterization of Melanoma Cell Lines Resistant to Vemurafenib and Evaluation of Their Responsiveness to EGFR- and MET-Inhibitor Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 23;21(1):E113.
207. Dong Z, Wang Y, Ding V, Yan X, Lv Y, Zhong M, et al. GLI1 activation is a key mechanism of erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2020 Oct;20(4):76.

208. Faião-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, Sandri S, Vicente ALSA, Scapulatempo-Neto C, et al. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene*. 2017 Mar 30;36(13):1849–61.
209. Lee S, Rauch J, Kolch W. Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 7;21(3):E1102.
210. Ge X, Lv X, Feng L, Liu X, Gao J, Chen N, et al. Metadherin contributes to the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*. 2012;7(6):e39449.
211. Kobayashi T, Shimizu Y, Terada N, Yamasaki T, Nakamura E, Toda Y, et al. Regulation of androgen receptor transactivity and mTOR-S6 kinase pathway by Rheb in prostate cancer cell proliferation. *Prostate*. 2010 Jun 1;70(8):866–74.
212. Li Y, Li X, Pu J, Yang Q, Guan H, Ji M, et al. c-Myc Is a Major Determinant for Antitumor Activity of Aurora A Kinase Inhibitor MLN8237 in Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2018 Dec;28(12):1642–54.
213. Yang X, Gong Y, Tang Y, Li H, He Q, Gower L, et al. Spry1 and Spry4 differentially regulate human aortic smooth muscle cell phenotype via Akt/FoxO/myocardin signaling. *PLoS One*. 2013;8(3):e58746.
214. Chen H, Liu X, Zhu W, Chen H, Hu X, Jiang Z, et al. SIRT1 ameliorates age-related senescence of mesenchymal stem cells via modulating telomere shelterin. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:103.
215. Hallas C, Phillipp J, Domanowsky L, Kah B, Tiemann K. BCL9L expression in pancreatic neoplasia with a focus on SPN: a possible explanation for the enigma of the benign neoplasia. *BMC Cancer*. 2016 Aug 18;16:648.
216. Zhang JH, He YL, Zhu R, Du W, Xiao JH. Deregulated expression of Cdc6 as BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia cells. *Tumour Biol*. 2017 Jun;39(6):1010428317713394.
217. Millena AC, Vo BT, Khan SA. JunD Is Required for Proliferation of Prostate Cancer Cells and Plays a Role in Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-induced Inhibition of Cell Proliferation. *J Biol Chem*. 2016 Aug 19;291(34):17964–76.
218. Lee S, Kim K, Ho JN, Jin H, Byun SS, Lee E. Analysis of resistance-associated gene expression in docetaxel-resistant prostate cancer cells. *Oncol Lett*. 2017 Sep;14(3):3011–8.
219. Wu Y, Gao Z, Zhang J. Transcription Factor E2F1 Aggravates Neurological Injury in Ischemic Stroke via microRNA-122-Targeted Sprouty2. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020;16:2633–47.
220. Cho JH, Patel B, Bonala S, Manne S, Zhou Y, Vadrevu SK, et al. Notch transactivates Rheb to maintain the multipotency of TSC-null cells. *Nat Commun*. 2017 Nov 29;8(1):1848.
221. Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, Manshouri T, Adli M, Hricik T, et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):155–9.
222. Regl G, Neill GW, Eichberger T, Kasper M, Ikram MS, Koller J, et al. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma. *Oncogene*. 2002 Aug 15;21(36):5529–39.

223. Andreucci E, Pietrobono S, Peppicelli S, Ruzzolini J, Bianchini F, Biagioni A, et al. SOX2 as a novel contributor of oxidative metabolism in melanoma cells. *Cell Commun Signal*. 2018 Nov 22;16(1):87.
224. Marzi I, Cipolleschi MG, D'Amico M, Stivarou T, Rovida E, Vinci MC, et al. The involvement of a Nanog, Klf4 and c-Myc transcriptional circuitry in the intertwining between neoplastic progression and reprogramming. *Cell Cycle*. 2013 Jan 15;12(2):353–64.
225. Casciati A, Tanori M, Manczak R, Saada S, Tanno B, Giardullo P, et al. Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype. *Cancers (Basel)*. 2020 Jan 17;12(1):E226.
226. Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Kaneko F. Expression of a sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2002 Jan;146(1):69–73.
227. Sacedón R, Varas A, Hernández-López C, Gutiérrez-deFrías C, Crompton T, Zapata AG, et al. Expression of Hedgehog proteins in the human thymus. *J Histochem Cytochem*. 2003 Nov;51(11):1557–66.
228. Koch A, Waha A, Hartmann W, Milde U, Goodyer CG, Sörensen N, et al. No evidence for mutations or altered expression of the Suppressor of Fused gene (SUFU) in primitive neuroectodermal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004 Oct;30(5):532–9.
229. Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Teppen T, Gaszner GL, Roberts RC, et al. GSK-3beta gene expression in human postmortem brain: regional distribution, effects of age and suicide. *Neurochem Res*. 2009 Feb;34(2):274–85.
230. Wang X, Wei S, Zhao Y, Shi C, Liu P, Zhang C, et al. Anti-proliferation of breast cancer cells with itraconazole: Hedgehog pathway inhibition induces apoptosis and autophagic cell death. *Cancer Letters*. 2017 Jan 28;385:128–36.
231. Partridge JJ, Madsen MA, Ardi VC, Papagiannakopoulos T, Kupriyanova TA, Quigley JP, et al. Functional analysis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases differentially expressed by variants of human HT-1080 fibrosarcoma exhibiting high and low levels of intravasation and metastasis. *J Biol Chem*. 2007 Dec 7;282(49):35964–77.
232. Yang Q, Huang J, Wu Q, Cai Y, Zhu L, Lu X, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition is associated with Skp2 expression in paclitaxel-resistant breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2014 Apr 15;110(8):1958–67.
233. Li K, He W, Lin N, Wang X, Fan QX. N-cadherin knock-down decreases invasiveness of esophageal squamous cell carcinoma in vitro. *World J Gastroenterol*. 2009 Feb 14;15(6):697–704.
234. Kallassy et al. - 1997 - Patched (ptch)-associated preferential expression .pdf [Internet]. [cited 2010 Oct 27]. Available from: file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrator/Desktop/hedgehog%20library/1997/Kallassy%201997.pdf
235. Eichberger T, Regl G, Ikram MS, Neill GW, Philpott MP, Aberger F, et al. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2004 May;122(5):1180–7.

236. Parsons JK, Saria EA, Nakayama M, Vessella RL, Sawyers CL, Isaacs WB, et al. Comprehensive mutational analysis and mRNA isoform quantification of TP63 in normal and neoplastic human prostate cells. *Prostate*. 2009 Apr 1;69(5):559–69.
237. Jasek-Gajda E, Jurkowska H, Jasińska M, Lis GJ. Targeting the MAPK/ERK and PI3K/AKT Signaling Pathways Affects NRF2, Trx and GSH Antioxidant Systems in Leukemia Cells. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 17;9(7):E633.
238. Ali SA, Niu B, Cheah KSE, Alman B. Unique and overlapping GLI1 and GLI2 transcriptional targets in neoplastic chondrocytes. *PLoS One*. 2019 Jan 29;14(1):e0211333.
239. Zubčić V, Rinčić N, Kurtović M, Trnski D, Musani V, Ozretić P, et al. GANT61 and Lithium Chloride Inhibit the Growth of Head and Neck Cancer Cell Lines Through the Regulation of GLI3 Processing by GSK3 $\beta$ . *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 3;21(17):E6410.
240. Fontaine JF, Andrade-Navarro MA. Gene Set to Diseases (GS2D): disease enrichment analysis on human gene sets with literature data. *Genomics and Computational Biology*. 2016;2(10):33.
241. Kamburov A, Pentchev K, Galicka H, Wierling C, Lehrach H, Herwig R. ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D712-717.
242. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016 Jun 20;54:1.30.1-1.30.33.
243. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D605–12.
244. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 3;45(W1):W98–102.
245. Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D91-94.
246. Dhiman G, Srivastava N, Goyal M, Rakha E, Lothion-Roy J, Mongan NP, et al. Metadherin: A Therapeutic Target in Multiple Cancers. *Front Oncol*. 2019;9:349.
247. Karbowniczek M, Robertson GP, Henske EP. Rheb inhibits C-raf activity and B-raf/C-raf heterodimerization. *J Biol Chem*. 2006 Sep 1;281(35):25447–56.
248. Liu Y, Hock JM, Sullivan C, Fang G, Cox AJ, Davis KT, et al. Activation of the p38 MAPK/Akt/ERK1/2 signal pathways is required for the protein stabilization of CDC6 and cyclin D1 in low-dose arsenite-induced cell proliferation. *J Cell Biochem*. 2010 Dec 15;111(6):1546–55.
249. Sinik L, Minson KA, Tentler JJ, Carrico J, Bagby SM, Robinson WA, et al. Inhibition of MERTK Promotes Suppression of Tumor Growth in BRAF Mutant and BRAF Wild-Type Melanoma. *Mol Cancer Ther*. 2019 Feb;18(2):278–88.

250. Tian T, Wang M, Lin S, Guo Y, Dai Z, Liu K, et al. The Impact of lncRNA Dysregulation on Clinicopathology and Survival of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018 Sep 7;12:359–69.
251. Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, Laurette P, Fiers M, Wouters J, et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature*. 2016 Mar 24;531(7595):518–22.
252. Farhan M, Wang H, Gaur U, Little PJ, Xu J, Zheng W. FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017 Jul 6;13(7):815–27.
253. Singleton KR, Crawford L, Tsui E, Manchester HE, Maertens O, Liu X, et al. Melanoma Therapeutic Strategies that Select against Resistance by Exploiting MYC-Driven Evolutionary Convergence. *Cell Rep*. 2017 Dec 5;21(10):2796–812.
254. Aaboe M, Birkenkamp-Demtroder K, Wiuf C, Sørensen FB, Thykjaer T, Sauter G, et al. SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and in vitro functional characterization. *Cancer Res*. 2006 Apr 1;66(7):3434–42.
255. Kumar R, Njauw CN, Reddy BY, Ji Z, Rajadurai A, Klebanov N, et al. Growth suppression by dual BRAF(V600E) and NRAS(Q61) oncogene expression is mediated by SPRY4 in melanoma. *Oncogene*. 2019 May;38(18):3504–20.
256. Sun T, Jiao L, Wang Y, Yu Y, Ming L. SIRT1 induces epithelial-mesenchymal transition by promoting autophagic degradation of E-cadherin in melanoma cells. *Cell Death Dis*. 2018 Jan 26;9(2):136.
257. Halaban R, Krauthammer M. RASopathy Gene Mutations in Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2016 Sep;136(9):1755–9.
258. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):599–602.
259. Wen Y, Chen H, Luo F, Zhao L, Shu M, Su S, et al. Chlamydia trachomatis Plasmid Protein pORF5 Up-Regulates ZFAS1 to Promote Host Cell Survival via MAPK/p38 Pathway. *Front Microbiol*. 2020;11:593295.
260. Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J, et al. BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7577–86.
261. Lupia A, Peppicelli S, Witort E, Bianchini F, Carloni V, Pimpinelli N, et al. CD63 tetraspanin is a negative driver of epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2014 Dec;134(12):2947–56.
262. Tsavachidou D, Coleman ML, Athanasiadis G, Li S, Licht JD, Olson MF, et al. SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64(16):5556–9.
263. Cronin JC, Loftus SK, Baxter LL, Swatkoski S, Gucek M, Pavan WJ. Identification and functional analysis of SOX10 phosphorylation sites in melanoma. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190834.

264. Wang S, Qiu L, Meng X, Dang N. Knock-down of filaggrin influences the mitogen-activated protein kinases signaling pathway in normal human epidermal keratinocytes. *Med Sci (Paris)*. 2018 Oct;34 Focus issue F1:94–8.
265. Meyer SC, Levine RL. Molecular pathways: molecular basis for sensitivity and resistance to JAK kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2014 Apr 15;20(8):2051–9.
266. Ganga AK, Kennedy MC, Oguchi ME, Gray S, Oliver KE, Knight TA, et al. Rab34 GTPase mediates ciliary membrane formation in the intracellular ciliogenesis pathway. *Curr Biol*. 2021 Jul 12;31(13):2895–2905.e7.
267. Vinciguerra M, Vivacqua A, Fasanella G, Gallo A, Cuzzo C, Morano A, et al. Differential phosphorylation of c-Jun and JunD in response to the epidermal growth factor is determined by the structure of MAPK targeting sequences. *J Biol Chem*. 2004 Mar 5;279(10):9634–41.
268. Jalili A, Wagner C, Pashenkov M, Pathria G, Mertz KD, Widlund HR, et al. Dual suppression of the cyclin-dependent kinase inhibitors CDKN2C and CDKN1A in human melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Nov 7;104(21):1673–9.
269. García Ruiz AJ, García-Agua Soler N, Herrera Acosta E, Zalaudek I, Malveyh J. Benefit–risk assessment of sonidegib and vismodegib in the treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *Drugs Context*. 2022 Jul 7;11:2022-1–2.
270. Kong X, Kuilman T, Shahrabi A, Boshuizen J, Kemper K, Song JY, et al. Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature*. 2017 Oct 12;550(7675):270–4.
271. Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc*. 2009;4(11):1591–613.
272. Plesca D, Mazumder S, Almasan A. DNA damage response and apoptosis. *Methods Enzymol*. 2008;446:107–22.
273. Weihua Z, Lin Q, Ramoth AJ, Fan D, Fidler IJ. Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell. *Cancer*. 2011 Sep 1;117(17):4092–9.
274. Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, McMahon AP. Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2623–8.
275. Pandolfi S, Stecca B. Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*. 2015;17:e5.
276. Réda J, Vachtenheim J, Vlčková K, Horák P, Vachtenheim J, Ondrušová L. Widespread Expression of Hedgehog Pathway Components in a Large Panel of Human Tumor Cells and Inhibition of Tumor Growth by GANT61: Implications for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Sep 10 [cited 2018 Dec 19];19(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6163708/>
277. Kurtović M, Piteša N, Bartoniček N, Ozretić P, Musani V, Čonkaš J, et al. RNA-seq and ChIP-seq Identification of Unique and Overlapping Targets of GLI Transcription Factors in Melanoma Cell Lines. *Cancers*. 2022 Jan;14(18):4540.



278. Stones CJ, Kim JE, Joseph WR, Leung E, Marshall ES, Finlay GJ, et al. Comparison of responses of human melanoma cell lines to MEK and BRAF inhibitors. *Front Genet.* 2013;4:66.
279. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 2014 Jul 15;111(2):292–9.
280. Ali SA, Niu B, Cheah KSE, Alman B. Unique and overlapping GLI1 and GLI2 transcriptional targets in neoplastic chondrocytes. Xie J, editor. *PLOS ONE.* 2019 Jan 29;14(1):e0211333.
281. Hu MC, Mo R, Bhella S, Wilson CW, Chuang PT, Hui CC, et al. GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. *Development.* 2006 Feb;133(3):569–78.
282. Masliah-Planchon J, Garinet S, Pasmant E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget.* 2016 Jun 21;7(25):38892–907.
283. Wei M, Yu H, Cai C, Gao R, Liu X, Zhu H. MiR-3194-3p Inhibits Breast Cancer Progression by Targeting Aquaporin1. *Front Oncol.* 2020;10:1513.
284. Palkina N, Komina A, Aksenenko M, Moshev A, Savchenko A, Ruksha T. miR-204-5p and miR-3065-5p exert antitumor effects on melanoma cells. *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):8269–80.
285. Li Y, Xun J, Wang B, Ma Y, Zhang L, Yang L, et al. miR-3065-3p promotes stemness and metastasis by targeting CRLF1 in colorectal cancer. *J Transl Med.* 2021 Oct 16;19(1):429.
286. Xing R. miR-3648 Promotes Prostate Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Adenomatous Polyposis Coli 2. *J Nanosci Nanotechnol.* 2019 Dec 1;19(12):7526–31.
287. Leick KM, Rodriguez AB, Melssen MM, Benamar M, Lindsay RS, Eki R, et al. The Barrier Molecules Junction Plakoglobin, Filaggrin, and Dystonin Play Roles in Melanoma Growth and Angiogenesis. *Ann Surg.* 2019 Oct;270(4):712–22.
288. Zhang G, Wang S. Proteomic approach to substrates related to MAPK pathway in 293T cells. *Cell Biol Int.* 2007 Jan;31(1):1–10.
289. Tudrej KB, Czepielewska E, Kozłowska-Wojciechowska M. SOX10-MITF pathway activity in melanoma cells. *Arch Med Sci.* 2017 Oct;13(6):1493–503.
290. Wen SY, Cheng SY, Ng SC, Aneja R, Chen CJ, Huang CY, et al. Roles of p38 $\alpha$  and p38 $\beta$  mitogen-activated protein kinase isoforms in human malignant melanoma A375 cells. *Int J Mol Med.* 2019 Dec;44(6):2123–32.
291. Jalili A, Wagner C, Pashenkov M, Pathria G, Mertz KD, Widlund HR, et al. Dual suppression of the cyclin-dependent kinase inhibitors CDKN2C and CDKN1A in human melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Nov 7;104(21):1673–9.
292. Comandante-Lou N, Baumann DG, Fallahi-Sichani M. AP-1 transcription factor network explains diverse patterns of cellular plasticity in melanoma cells. *Cell Rep.* 2022 Aug 2;40(5):111147.
293. Chen CH, Lin DS, Cheng CW, Lin CJ, Lo YK, Yen CC, et al. Cdc6 cooperates with c-Myc to promote genome instability and epithelial to mesenchymal transition EMT in zebrafish. *Oncotarget.* 2014 Aug 15;5(15):6300–11.

294. Pimienta G, Pascual J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle*. 2007 Nov 1;6(21):2628–32.
295. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*. 2003 Aug;5(8):711–9.
296. Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciano P, Downward J, Parker PJ. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol*. 1994 Sep 1;4(9):798–806.
297. Kalli M, Li R, Mills GB, Stylianopoulos T, Zervantonakis IK. Mechanical Stress Signaling in Pancreatic Cancer Cells Triggers p38 MAPK- and JNK-Dependent Cytoskeleton Remodeling and Promotes Cell Migration via Rac1/cdc42/Myosin II. *Mol Cancer Res*. 2022 Mar 1;20(3):485–97.
298. Guo X, Ma N, Wang J, Song J, Bu X, Cheng Y, et al. Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells. *BMC Cancer*. 2008 Dec 18;8:375.
299. Balko JM, Schwarz LJ, Bhola NE, Kurupi R, Owens P, Miller TW, et al. Activation of MAPK pathways due to DUSP4 loss promotes cancer stem cell-like phenotypes in basal-like breast cancer. *Cancer Res*. 2013 Oct 15;73(20):6346–58.
300. Gupta A, Towers C, Willenbrock F, Brant R, Hodgson DR, Sharpe A, et al. Dual-specificity protein phosphatase DUSP4 regulates response to MEK inhibition in BRAF wild-type melanoma. *Br J Cancer*. 2020 Feb;122(4):506–16.
301. Kumar R, Njauw CN, Reddy BY, Ji Z, Rajadurai A, Klebanov N, et al. Growth suppression by dual BRAF(V600E) and NRAS(Q61) oncogene expression is mediated by SPRY4 in melanoma. *Oncogene*. 2019 May;38(18):3504–20.
302. Xu S, Liu Y, Meng Q, Wang B. Rab34 small GTPase is required for Hedgehog signaling and an early step of ciliary vesicle formation in mouse. *J Cell Sci*. 2018 Nov 8;131(21):jcs213710.
303. Karbowniczek M, Robertson GP, Henske EP. Rheb inhibits C-raf activity and B-raf/C-raf heterodimerization. *J Biol Chem*. 2006 Sep 1;281(35):25447–56.
304. DI E, M L, R M, L S, A A, Ts J, et al. Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. *Cilia* [Internet]. 2012 Aug 10 [cited 2022 Oct 28];1(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23351307/>
305. Kuonen F, Huskey NE, Shankar G, Jaju P, Whitson RJ, Rieger KE, et al. Loss of Primary Cilia Drives Switching from Hedgehog to Ras/MAPK Pathway in Resistant Basal Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2019 Jul;139(7):1439–48.
306. Liu F, Liu D, Yang Y, Zhao S. Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Oncol Lett*. 2013 Apr;5(4):1261–5.
307. Zhang G, Liu J, Zhang Y, Qu J, Xu L, Zheng H, et al. Cbl-b-dependent degradation of FLIP(L) is involved in ATO-induced autophagy in leukemic K562 and gastric cancer cells. *FEBS Lett*. 2012 Sep 21;586(19):3104–10.
308. Wang Y, Han C, Lu L, Magliato S, Wu T. Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 2013 Sep;58(3):995–1010.

309. Wang J, Gu S, Huang J, Chen S, Zhang Z, Xu M. Inhibition of autophagy potentiates the efficacy of Gli inhibitor GANT-61 in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *BMC Cancer*. 2014 Oct 17;14:768.
310. Vega-Rubín-de-Celis S, Zou Z, Fernández ÁF, Ci B, Kim M, Xiao G, et al. Increased autophagy blocks HER2-mediated breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Apr 17;115(16):4176–81.
311. Paillas S, Boissière F, Bibeau F, Denouel A, Mollevi C, Causse A, et al. Targeting the p38 MAPK pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):1041–9.
312. Lim CB, Prêlé CM, Baltic S, Arthur PG, Creaney J, Watkins DN, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species drive GANT61-induced mesothelioma cell apoptosis. *Oncotarget*. 2015 Jan 30;6(3):1519–30.
313. Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete 'sub-G1' peaks on DNA content histograms. *Cytometry A*. 2007 Mar;71(3):125–31.
314. Urdiciain A, Erausquin E, Zelaya MV, Zazpe I, Lanciego JL, Meléndez B, et al. Silencing of Histone Deacetylase 6 Decreases Cellular Malignancy and Contributes to Primary Cilium Restoration, Epithelial-to-Mesenchymal Transition Reversion, and Autophagy Inhibition in Glioblastoma Cell Lines. *Biology (Basel)*. 2021 May 26;10(6):467.

## 8. SAŽETAK

Signalni put HH-GLI predstavlja put prijenosa od iznimne važnosti za normalan embrionalni razvoj. U velikom broju tumora dolazi do promijenjene aktivnosti signalnog puta čime se promovira maligna transformacija stanica. Poznato je da važnu ulogu u tom procesu igra nekanonska interakcija HH-GLI i signalnog puta RAS/RAF/MAPK. Signalni put RAS/RAF/MAPK predstavlja put prijenosa koji je najčešće promijenjen u melanomu, stoga je važna meta za razvoj potencijalnih terapija. Nekanonska interakcija HH-GLI i RAS/RAF/MAPK je donekle opisana, no još uvijek brojni mehanizmi aktivacije, proteini koji sudjeluju u tom procesu te konačni ishodi tih interakcija na stanicu nisu poznati. Upravo istraživanje interakcije signalnih puteva može biti važno za razvoj potencijalne kombinirane terapije, jedne od aktualnih strategija za nadilaženje otpornosti na terapiju.

U ovom radu, kombinirajući dva istraživačka pristupa, istražena je interakcija signalnih puteva RAS/RAF/MAPK i HH-GLI u rezistenciji na lijekove u staničnim linijama melanoma. Prvi istraživački smjer se temeljio na identifikaciji transkripcijskih meta proteina GLI koje su potencijalno uključene u regulaciju RAS/RAF/MAPK, a drugi na razvoju staničnih linija rezistentnih na GANT61, specifični inhibitor proteina GLI. Metodom *ChIP-seq* identificirane su potencijalne transkripcijske mete proteina GLI uključene u regulaciju RAS/RAF/MAPK, koje predstavljaju potencijalne medijatore interakcija između ova dva signalna puta. Uspostavljene stanične linije su karakterizirane, te je uočena različita aktivnost signalnih puteva ovisno o mutacijskom statusu linija. Dok obje rezistentne linije pokazuju povećanje invazivnih karakteristika u odnosu na ishodišne linije, razlikuju se međusobno u staničnim procesima poput autofagije i staničnog ciklusa.

Analizom potencijalnih transkripcijskih meta u rezistentnim linijama, uočena je smanjena ekspresija regulatora ciliogeneze, proteina RAB34 u staničnoj liniji s mutacijom u genu *NRAS*. U konačnici je pokazano da stanična linija formira manji broj cilija, što predstavlja promjenu koja se može povezati sa smjenom signalne aktivnosti HH-GLI i RAS/RAF/MAPK koja je prethodno opažena u navedenoj liniji. Ovaj fenomen nije zapažen u staničnoj liniji divljeg tipa što upućuje na to da se radi o drugim mehanizmima koji su uključeni u razvoj rezistencije (aktivacije kraka p38). Ovim radom je pokazano da primarna cilije predstavlja potencijalnu poveznicu između signalnog puta RAS/RAF/MAPK i HH-GLI u staničnoj liniji melanoma s mutacijom u genu *NRAS*, te su potrebna daljnja istraživanja da se detaljnije opiše kako regulacija ciliogeneze utječe na dinamiku signalnih puteva i sami proces rezistencije na lijekove. Također, pokazano je da iako su uspostavljene rezistentne stanične linije na isti spoj, GANT61, mehanizmi koji doprinose razvoju rezistencije se međusobno razlikuju.

## 9. SUMMARY

Hedgehog-GLI is a signaling pathway essential for normal embryonal development. Aberrant HH-GLI is known for regulating a wide span of carcinogenesis aspects and therefore is connected with the development of various cancer types, including melanoma. It is known that the noncanonical interaction HH-GLI and RAS/RAF/MAPK is one of main driver of melanoma development. RAS/RAF/MAPK is one of the most deregulated pathways in melanoma and thus it represents an important target for therapy development. There are previously described mechanisms of the noncanonical interaction between HH-GLI and RAS/RAF/MAPK, but many other mechanisms, proteins involved in them and the outcomes are still not fully understood. By investigating signaling pathway interactions, we can bring new insights important for combined therapy development which presents one of current strategies to overcome therapy resistance.

In this study, we investigated the interaction between RAS/RAF/MAPK and HH-GLI in resistant melanoma cell lines, using two experimental approaches. The first experimental approach is based on the identification of potential GLI transcription target, and the second on the establishment of GANT61 (specific GLI inhibitor) resistant cell lines. By using ChIP-seq, we identified potential transcription targets which present also potential mediators between RAS/RAF/MAPK and HH-GLI. Resistant cell lines were characterized and we noticed that signaling differences between them. *NRAS* mutated resistant cell line has downregulated protein expression of HH-GLI and upregulated RAS/RAF/MAPK components, while the wild type cell line shows downregulation of both signaling pathways. Both cell lines have a higher invasive properties than the control cell lines and by gaining resistance they underwent through changes in cell processes like cell cycle and autophagy.

By analyzing potential transcription targets in established resistant cell lines, we noticed that ciliogenesis regulator, RAB34 protein was downregulated in the *NRAS* mutated resistant cell line. We noticed that the *NRAS* mutated resistant cell lines shows primary cilia loss, which makes sense when we take in count the changes in HH-GLI and RAS/RAF/MAPK signaling dynamics which were observed previously. This phenomenon was specific for the *NRAS* mutated cell line, which suggest that other mechanisms are involved in resistance development of the wild type cell line (activation of p38 pathway). This study proposes that primary cilia present a potential link between RAS/RAF/MAPK and HH-GLI in resistance. Further investigation is necessary to describe in more depth how ciliogenesis regulation affects the signaling pathway dynamics and therapy resistance development. We need to take in count that even though we established cell lines resistant to the same drug, signaling mechanisms are different.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 06.08.1994.godine u Splitu (djevojačko prezime Rinčić). Osnovnu školu Petra Berislavića, a potom srednju školu Ivana Lucića (Opća gimnazija) završila sam u Trogiru. 2013. godine upisala sam preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, te stekla titulu prvostupnika obranom završnog rada pod nazivom "Starenje i produženje životnog vijeka" pod vodstvom doc.dr.sc. Duje Lisičića. Tri godine nakon, stekla sam titulu magistre s odličnim uspjehom (*cum laude*) na diplomskom studiju Eksperimentalne biologije (modul Fiziologija i imunobiologija) na istom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom "Izrada "knock-out" stanične linije za gen *GLI1* primjenom sustava CRISPR/Cas9" izradila sam u Laboratoriju za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom sadašnje mentorice doc.dr.sc. Maje Sabol. Posljednje godine diplomskog studija bila sam dobitnica lokalne stipendije Općine Marina zbog iznimnog uspjeha tijekom studiranja.

Tijekom fakultetskog obrazovanja sam sudjelovala na tri studentske prakse. Dvije studentske prakse sam odradila pod vodstvom doc.dr.sc. Duje Lisičića gdje sam sudjelovala u istraživanju bihevioralnih aspekata gušterica vrste *Podarcis* te dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Također sam odradila studentsku praksu pod vodstvom prof.dr.sc. Domagoja Đikića u sklopu koje sam istraživala učinke antiepileptika valproata na antioksidacijski sustav u stanicama. Osim studentskih praksi, bila sam aktivna u organizaciji znanstveno-popularnih radionica u sklopu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta poput Noći biologije (2016. i 2017. godine) te Znanstvenog piknika (2015.).

2019. godine sam zaposlena na radno mjesto asistenta u Laboratoriju za nasljedni rak, Instituta Ruđer Bošković u sklopu projekta doc.dr.sc. Maje Sabol "GLI kod: regulacija GLI koda u tumorima ovisnim o BRAF/NRAS mutacijama" koji je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost. Godinu dana nakon, upisala sam poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularnih bioznanosti, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Instituta Ruđer Bošković i Sveučilišta u Dubrovniku. Tijekom tog perioda sam sudjelovala na brojnim radionicama i konferencijama pod domaćom i međunarodnom organizacijom te i sama bila u organizacijskom odboru dvaju konferencija Hrvatskog društva za istraživanje raka s međunarodnim sudjelovanjem (2018. i 2022.). Imam 17 priopćenja u obliku postera od kojih sam na 6 prezentirajući autor. Za postersko priopćenje održano u sklopu šeste konferencije Hrvatskog društva za istraživanje raka s međunarodnim sudjelovanjem sam dobila prvu nagradu sponzoriranu od strane Europskog društva za istraživanje raka (EACR). Također, održala sam dva predavanja, prvo u sklopu 10. obljetnice postojanja Hrvatskog društva za istraživanje raka te drugo u sklopu konferencije Srpskog društva za istraživanje raka gdje sam

bila odabrana za kratko usmeno izlaganje. Osim znanstvenih aktivnosti, također sam bila uključena u održavanje praktične nastave iz kolegija “Metode istraživanja u molekularnoj onkologiji” na sveučilišnom poslijediplomskom doktorskom studiju Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te kolegija “Kombinacija terapija i mehanizmi u liječenju malignih bolesti” i “Biologija tumorskih i normalnih stanica” na sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom studiju “Molekularne bioznanosti” Sveučilišta “Josip Juraj Strossmayer” u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković. Član sam Federacije europskih biokemijskih društava (FEBS), Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), Europskog društva za istraživanje raka (EACR) i Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR).

Tijekom zaposlenja na Institutu Ruđer Bošković, boravila sam u periodu od mjesec dana na Sveučilištu Leeds u Ujedinjenom kraljevstvu kod prof.dr.sc. Natalie Riobo del Galdo koja ima dugogodišnje iskustvo rada u polju Hedgehog-GLI, što je bilo od iznimne vrijednosti za izradu ove doktorske disertacije.

Autor sam 4 znanstvena rada:

Za rad (3) sam nagrađena godišnjom nagradom Instituta Ruđer Bošković za 2020. godinu.

1. Kurtović M, **Piteša N**, Bartoniček N, Ozretić P, Musani V, Čonkaš J, Petrić T, King C, Sabol M. RNA-seq and ChIP-seq Identification of Unique and Overlapping Targets of GLI Transcription Factors in Melanoma Cell Lines. *Cancers*, 14 (18), 4540, 20 (2022) IF: 6.575
2. Trnski D, Sabol M, Tomić S, Štefanac I, Mrčela M, Musani V, **Rinčić N**, Kurtović M, Petrić T, Levanat S, Ozretić P. SHH-N non-canonically sustains androgen receptor activity in androgen-independent prostate cancer cells. *Scientific reports*, 11, 1, 14880 (2021) IF: 4.379
3. Zubčić V\*, **Rinčić N\***, Kurtović M, Trnski D, Musani V, Ozretić P, Levanat S, Leović D, Sabol M. GANT61 and Lithium Chloride Inhibit the Growth of Head and Neck Cancer Cell Lines Through the Regulation of GLI3 Processing by GSK3beta. *International journal of molecular sciences*, 21, 6410, 13 (2020). \* dijeljeno prvo autorstvo IF: 5.924
4. Trnski D, Gregorić M, Levanat S, Ozretić P, **Rinčić N**, Majić Vidaković T, Kalafatić D, Maurac I, Orešković S, Sabol M, Musani V. Regulation of Survivin isoform expression by GLI proteins in ovarian cancer. *Cells*, 8, 128 (2019) IF: 4,366